

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2000-514421

(P2000-514421A)

(43) 公表日 平成12年10月31日 (2000. 10. 31)

| (51) Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テマコード* (参考) |
|-----------------------------------|------|---------------|-------------|
| A 6 1 K 48/00 | | A 6 1 K 48/00 | |
| 31/70 | | 31/70 | |
| 35/76 | | 35/76 | |
| 38/00 | | A 6 1 P 3/04 | |
| 38/22 | | 3/06 | |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 63 頁) 最終頁に続く | | | |

(21) 出願番号 特願平10-503564
 (86) (22) 出願日 平成9年6月26日 (1997. 6. 26)
 (85) 翻訳文提出日 平成10年12月25日 (1998. 12. 25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US 97/11229
 (87) 国際公開番号 WO 97/49827
 (87) 国際公開日 平成9年12月31日 (1997. 12. 31)
 (31) 優先権主張番号 08/672, 461
 (32) 優先日 平成8年6月26日 (1996. 6. 26)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 コーネル リサーチ ファウンデーション、インコーポレイティッド
 アメリカ合衆国、ニューヨーク州
 14850、イサカ、ソーンウッド ドライヴ、
 20、スイート 105、コーネル ビジネス
 アンド テクノロジー パーク
 (72) 発明者 クリスタル、ロナルド ジー。
 アメリカ合衆国、メリーランド州 20852、
 ボトマック、キャナル ヴィスタ コー
 ト、13712
 (74) 代理人 弁理士 高島 一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脂肪細胞におけるアデノウイルスを介した遺伝子導入および関連のインプラント

(57) 【要約】

本発明は、アデノウイルスを介した脂肪細胞への遺伝子導入、特に、肥満症を軽減する手段としての毒性遺伝子の導入および新しい血管の増殖を誘発する血管形成誘導物質をコードする遺伝子の導入、並びに脂肪組織インプラントに関する。

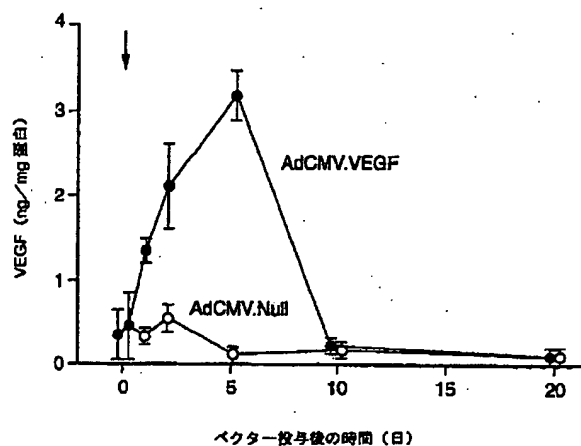


図 3

【特許請求の範囲】

1. プロモーターと、それに機能的に連結した、治療蛋白質または治療mRNAをコードする核酸配列とを含むアデノウイルスベクターを、該アデノウイルスベクターの脂肪細胞内への侵入、該核酸配列の発現および該蛋白質またはmRNAの産生をもたらすべく、該脂肪細胞に接触させることを含む、インビボでの脂肪細胞の改変方法。
2. 該アデノウイルスベクターが複製欠損である請求の範囲1の方法。
3. 該蛋白質が、全身で作用する分泌蛋白質および該脂肪細胞上もしくはその付近で作用する蛋白質からなる群より選択される、請求の範囲1または2の方法。
4. 該蛋白質が、毒素、血管形成誘導増殖因子、アジプシンおよびOb蛋白質からなる群より選択される請求の範囲1または2の方法。
5. 該プロモーターが脂肪細胞特異的プロモーターである請求の範囲1～4のいずれかの方法。
6. 該プロモーターが、aP2遺伝子調節領域およびp154ポリペプチド遺伝子調節領域からなる群より選択される請求の範囲5の方法。
7. 該プロモーターが構成的プロモーターである請求の範囲1～5のいずれかの方法。
8. 該方法が、宿主内の別の部位への該脂肪細胞の移入をさらに含むものである請求の範囲1～7のいずれかの方法。
9. 該方法が、肥満症、糖尿病、体脂肪蓄積亢進、高血糖、高インスリン症、低温症、高血圧症、高コレステロール血症および高脂血症からなる群より選択されるエネルギー貯蔵障害の治療に用いられるものである、請求の範囲1～8のいずれかの方法。
10. 該方法が血管新生を刺激するのに用いられるものである請求の範囲1～8のいずれかの方法。
11. 脂肪細胞特異的プロモーターと、それに機能的に連結した、治療蛋白質または治療mRNAをコードする核酸配列とを含むアデノウイルスベクター。
12. 該ベクターが複製欠損である請求の範囲11のベクター。

13. 該プロモーターが、aP2遺伝子調節領域およびp154ポリペプチド遺伝子調節領域からなる群より選択される請求の範囲11または12のベクター。

14. 該蛋白質が、全身で作用する分泌蛋白質および該脂肪細胞上もしくはその付近で作用する蛋白質からなる群より選択される、請求の範囲11～13のいずれかのベクター。

15. 該蛋白質が、毒素、血管形成誘導増殖因子、アジプシンおよびOb蛋白質からなる群より選択される請求の範囲11～14のいずれかのベクター。

16. 請求の範囲11～15のいずれかのベクターを含有する宿主細胞。

17. 構成的プロモーターと、それに機能的に連結した、全身で作用する分泌蛋白質および該脂肪細胞上もしくはその付近で作用する蛋白質からなる群より選択される蛋白質をコードする核酸配列とを含むアデノウイルスベクターを含有する脂肪細胞。

18. 該ベクターが複製欠損である請求の範囲17のベクター。

19. プロモーターと、それに機能的に連結した、毒素、血管形成誘導増殖因子、アジプシンおよびOb蛋白質からなる群より選択される蛋白質をコードする核酸配列とを含むアデノウイルスベクターを含有する脂肪細胞。

20. 該ベクターが複製欠損である請求の範囲19のベクター。

21. (a) 宿主内への移植のためにドナーから単離された脂肪組織および(b) 該脂肪組織に関連する血管形成誘導物質を含む脂肪組織インプラント。

22. 該血管形成誘導物質が、単離された血管形成誘導蛋白、または血管形成誘導蛋白および医薬上許容される担体を含む血管形成誘導組成物である、請求の範囲21の脂肪組織インプラント。

23. 該血管形成誘導物質が、血管形成誘導遺伝子を含む遺伝子導入ベクターである請求の範囲21の脂肪組織インプラント。

24. 該脂肪組織が、血管形成誘導遺伝子を含む遺伝子導入ベクターと血管形成誘導蛋白の両方と接触する、請求の範囲21の脂肪組織インプラント。

25. 該脂肪組織インプラントが、該脂肪組織に関連するリンパ形成誘導蛋白またはリンパ形成誘導遺伝子を含む遺伝子導入ベクターをさらに含有する、請求の

範囲21～24のいずれかの脂肪組織インプラント。

26. 該ドナーおよび該宿主が同一である請求の範囲21～25のいずれかの脂肪組織インプラント。

27. 該血管形成誘導物質がVEGF蛋白である請求の範囲21～26のいずれかの脂肪組織インプラント。

28. 該血管形成誘導物質が、VEGF蛋白をコードする遺伝子を含む遺伝子導入ベクターである、請求の範囲21～26のいずれかの脂肪組織インプラント。

【発明の詳細な説明】

脂肪細胞におけるアデノウイルスを介した遺伝子導入および関連のインプラント

発明の技術分野

本発明は、改変された脂肪細胞および脂肪細胞へのアデノウイルスを介した遺伝子導入に有用なベクターに関する。また、本発明は、血管形成誘導因子および／または他の治療的因子で脂肪組織を処理することにより改変された脂肪組織から作られるインプラントに関する。

発明の背景

遺伝子治療は、遺伝情報を薬理剤として使用することを必要とする。遺伝子治療は当初、遺伝病治療の一手段と理解されていたが、現在では、局所的および／または全身的使用のために治療的なmRNAもしくは蛋白質を送達する強力な道具として認識されている（例えば、Friedmann, Science, 244, 1275-1281(1989); Miller, Nature, 357, 455-460(1992)を参照）。一般に、遺伝子治療には2つのアプローチ、すなわち、生体外 (ex vivo) および生体内 (インビボ) アプローチがある。ex vivoアプローチでは、宿主から除去した細胞を、宿主に戻す前に試験管内 (インビトロ) で遺伝的に改変する（例えば、米国特許第5,399,346号 (Andersonら) を参照）。インビボアプローチでは、導入のためのビークルとしていかなる細胞も使用することなく、遺伝情報自体を直接宿主に導入する。

どちらのアプローチもいわゆる「治療」遺伝子を宿主に導入するために使用されている。広く考えれば、治療遺伝子とは、特定の病状、状態、障害もしくは症候群において、根元的な蛋白質欠損を修正するか補填する遺伝子、あるいは別の遺伝子を調節するか別の遺伝子にコードされる産物の負の効果を打ち消し得る遺伝子である。例えば、ex vivoアプローチは、アデノシンデアミナーゼ欠損症の治療におけるTリンパ球の改変、家族性高コレステロール血症の治療における肝細胞の改変、および腫瘍性疾患の治療における腫瘍浸潤性リンパ球の改変に使用

されている (Setoguchiら, J. Investig. Dermatol., 102, 415-421 (1994) に総説)。インビボアプローチは、特に、嚢胞性線維症および腫瘍性疾患の治療に使用されている (Setoguchiら, 上述)。これらの適用の大部分において、発現

させるべき治療遺伝子のコーディング配列は、異種プロモーター（特に、構成的もしくは誘導性プロモーター）の制御下に置かれ、組換え治療遺伝子が作られている。

広く行われている遺伝子治療へのアプローチでは、遺伝子導入のためのベクターとしてレトロウイルスを使用してきた。しかしながら、レトロウイルスは、それらの適用、特にインビボでの適用を、大きく制限する数多くの欠点を有する（Mastrangeliら, J. Clin. Invest., 91, 225-34(1993);Burnsら, Proc. Natl. Acad. Sci., 90, 8033-37(1993)）。したがって、多くの研究者は、遺伝子治療のためのベクターとしてアデノウイルスに頼っている（Horwitz, 「ウイルス学」(Virology), 第2版, Fieldsら編(NY:Raven Press, 1990), 1679-1721;Berkner, BioTechniques, 6, 606-629(1988);Ginsberg (編), 「アデノウイルス」(The Adenoviruses)(NY:Plenum Press, 1984);Horwitz, 上述;Rosenfeldら, Science, 252, 431-434(1991);Rosenfeldら, Cell, 68, 143-155(1992);Quantinら, Proc. Natl. Acad. Sci., 89, 2581-2584(1992);Crystalら, Nucleic Acids Res., 21, 1607-12(1993)）。複製欠損組換えアデノウイルスベクターは、インビトロおよびインビボで遺伝子を導入するのに非常に効率的であり、現在、広く多様な応用に使用されている（例えば、Rosenfeldら(1991), 上述;Rosenfeldら(1992), 上述;Crystalら, Nat. Genet., 8, 42-51(1994);Lemarchandら, Circ. Res., 72, 1132-1138(1993);Guzmanら, Circ. Res., 73, 1202-1207(1993);Bajocchiら, Nat. Genet., 3, 229-234(1993);Mastrangeliら, 上述, を参照)。

アデノウイルスは、エンペロープのない二本鎖DNAウイルスとして存在する（Horwitz, 上述）。アデノウイルスは、標的細胞に生物材料を導入する効率的な手段を提供する（Oteroら, Virology, 160, 75-80(1987);FitzGeraldら, Cell, 32, 607-617(1983);Sethら, Mol. Cell Biol., 4, 1528-1533(1984);Yoshimura, Cell Struct. Funct., 10, 391-404(1985);Deferら, J. Virol., 64, 3661-3673(1990);Rosenfeldら(1991), 上述;Curielら, Proc. Natl. Acad. Sci., 88, 8850-8854(1991);Rosenfeldら(1992), 上述;Quantinら, 上述;Curielら, Hum. Gene Therapy, 3, 147-154(1992)）。アデノウイルスは受容体を介したエンドサ

イトーシス経路によって細胞に入る。最初のウィルス-受容体相互作用において、アデノウィルスは、その外表面上のファイバーにより細胞表面上に存在する特異的受容体と結合する (Ginsberg, 上述; Horwitz, 上述; Sethら, 「ウィルスの接着と細胞への侵入」 (In: Virus Attachment and Entry into Cells), Colwellら編, (DC: American Society for Microbiology, 1986), 191-195)。接着した後、アデノウィルスが結合した受容体は被覆された窪みに密集し、ウィルスはクラスリン被覆小胞内に、その後、エンドソームもしくはレセプトソームと呼ばれるエンドソーム小胞内に内部移行する (FitzGeraldら, 上述)。アデノウィルスは最終的に核に輸送され、そこで初期核酸合成を指示する (FitzGeraldら, 上述; Sethら (1984), 上述; Sethら (1986), 上述; Sethら, J. Virol., 51, 650-655 (1984a); Sethら, J. Biol. Chem., 259, 14350-14353 (1984b); Sethら, J. Biol. Chem., 260, 9598-9602 (1985); Sethら, J. Biol. Chem., 260, 14431-14434 (1985); Blumenthalら, Biochemistry, 25, 2231-2237 (1986); Sethら, J. Virol., 61, 883-888 (1987))。

アデノウィルスが容易に細胞に侵入する能力は、巨大分子を細胞内に輸送する手段として利用されている (Oteroら, 上述; FitzGeraldら, 上述; Sethら (1984), 上述; Yoshimura, 上述; Deferら, 上述; Rosenfeldら (1991), 上述; Curielら (1991), 上述; Rosenfeldら (1992), 上述; Quantinら, 上述; Curielら (1992), 上述)。このような導入を行う2つの手段がある。第一手段で、アデノウィルスが、通常のアデノウィルス構成成分の代わりに、あるいはそれに加えて、該アデノウィルス内部にパッケージングされた非ウィルス性の巨大分子を導入するのに使用されている (Rosenfeldら (1991), 上述; Rosenfeldら (1992), 上述;

Quantinら, 上述; Berkner, 上述)。第二の手段で、アデノウィルスが、(例えば、ポリリジン残基を通じてアデノウィルスカプシド蛋白に対する抗体に核酸を結合させることによって (Curielら (1992), 上述)) アデノウィルスの表面に連結された非ウィルス性巨大分子、あるいは一緒に内部移行されて、アデノウィルス受容体-エンドソーム複合体 (Oteroら, 上述; FitzGeraldら, 上述; Sethら (1984), 上述; Yoshimura, 上述; Oteroら, 上述; Deferら, 上述) 中で積荷として一緒

に持って行かれる「傍観者」プロセスにおける非ウイルス性巨大分子、の導入を仲介するのに使用されている。このような傍観者プロセスは、リガンドに連結されたプラスミドDNA (Curieら(1991), 上述; Curieら(1992), 上述; Cottenら, Proc. Natl. Acad. Sci., 89, 6094-098(1992)); Rosenfeldら (1992), 上述; Quantinら, 上述; Cottenら, J. Virology, 67, 3777-3785(1993); Wagnerら, Proc. Natl. Acad. Sci., 78, 144-145(1981))、および非特異的リンカーもしくはリンカー-リガンド複合体により修飾されていないプラスミドDNA (Yoshimuraら, J. Biol. Chem., 268, 2300-303(1993); PCT出願WO 95/21259 (Sethら))を含む、種々の非ウイルス性巨大分子の導入を増大させるのに使用されている。

最近、Setoguchiら (Setoguchiら, 上述) は、プロモーターとしてのラウス肉腫ウイルスロングターミナルリピートの制御下にある β -ガラクトシダーゼリポーター遺伝子コーディング配列を担持する複製欠損組換えアデノウイルスベクターの、脂肪細胞へのインビボでのアデノウイルスを介した遺伝子導入を開示した。同様に、Claymanら (Claymanら, Cancer Gene Therapy, 2, 105-111 (1995)) は、 β -ガラクトシダーゼリポーター遺伝子を担持する組換えアデノウイルスベクターをマウスに粘膜下注射すると、針痕に沿った脂肪細胞のまばらな染色が生じることを開示した。

アデノウイルス以外のベクターおよび送達手段を用いて研究している他の研究者らは、リポーター遺伝子以外の遺伝子を脂肪細胞にインビボで導入している。特に、Rossら (Rossら, Genes Devel., 1318-1324(1993)) は、脂肪細胞特異的

な脂肪細胞P2 (aP2) プロモーターの制御下にある弱毒化されたジフテリア毒素A鎖を脂肪組織に遺伝子導入することにより、肥満が減少することを開示した。Yamaizumiら (Yamaizumiら, Cell, 15, 245-50 (1978)) は、ジフテリア毒素Aフラグメントの導入による殺細胞を開示し、Gregoryら (Gregoryら, PCT出願WO 95/11984) は、条件付きの自殺遺伝子であるチミジンキナーゼを使用するなどの、細胞死を誘発する手段を開示した。同様に、Gravesら (Gravesら, Genes & Development, 5, 428-37(1991)) およびRossら (Rossら, Proc. Natl. Acad. Sci., 89, 7561-65(1992); Rossら, Proc. Natl. Acad. Sci., 87, 9590-94(1

990)) はそれぞれ、a P 2 遺伝子の5' -調節領域に位置する脂肪細胞特異的エンハンサーを開示した。

同様に、毒素遺伝子の細胞特異的な発現によって特異的な細胞系列を削除する方法 (Palmiterら, Cell, 50, 435-43(1987);Bernsteinら, Mol. Biol. Med., 6, 523-30(1989);Behringerら, Genes & Development, 2, 453-61(1988);Hughesら, P C T出願WO 92/09616)) を開示している文献もある。使用される方法は、通常、細胞特異的エンハンサー／プロモーターが毒性の遺伝子産物の発現を駆動するのに用いられるキメラ遺伝子を、受精卵にマイクロインジェクションすることを必要とする。このアプローチの変法において、Hughesら (Hughesら, 上述) は、筋原性の分化を誘発するニワトリのc - s k i 蛋白をコードするベクターを導入することによって、宿主の脂肪組織の量が減少することを開示した。

遺伝子導入の手段としてアデノウイルスを含まない文献は、特異的な治療目的を達成するためにインビボで脂肪細胞を改変し得る、さらなる方法を示唆している。特に、Spiegelmanら (Spiegelmanら, J. Biol. Chem., 268(10), 6823-26 (1993)) は、脂肪細胞の遺伝子発現制御を再検討し、「脂肪生成遺伝子の発現を制御することにより代謝に影響を与えること」および細胞分化または肥満に関連する「これらのキー・レギュレーターを標的化することにより脂肪生成および全身的代謝を妨害すること」を開示した。Gravesら (Gravesら, 上述) は、「いくつかの肥満／糖尿病マウスモデルにおける肥満と糖尿病の関係は・・・毒素もし

くは脂質の蓄積に影響する種々の受容体の送達を通じて、脂肪細胞の形成および／または脂質の蓄積を直接抑制することによって究明し得るだろう」と開示した。Rossら (Rossら(1990), 上述) は、組織特異的発現をモニターする手段として、リポーター遺伝子のコーディング配列に連結された脂肪細胞特異的なa P 2 遺伝子調節領域を含むトランスジェニックマウスの産生を開示し、「外因性遺伝子の脂肪指向的な発現は、脂肪の貯蔵を変化させ、そうしてトランスジェニック動物の肥満度を直接的に操作する有効な方法かもしれない」と示唆している。Rossら (Rossら(1992), 上述) はさらに、オンコジーンのような、連結された外因性遺伝子の発現を脂肪組織に指向させる手段として、シミアンウイルス40 (S V 4

0) トランスフォーミング遺伝子に連結された脂肪細胞特異的な a P 2 遺伝子調節領域を含むトランスジェニックマウスの産生を開示した。

他にも脂肪細胞の改変と関連性を有する文献がある。特に、合衆国特許第5,268,295号 (Serrero) は、分化後の脂肪細胞株において大量に発現する、p 1 5 4 と呼ばれる哺乳類脂肪細胞特異的ポリペプチドに関する。’ 295号特許はネズミおよびヒトの p 1 5 4 ポリペプチド、それをコードするDNAおよびRNA分子、その調製方法、並びに該ポリペプチドに特異的な抗体を開示している。Flierら (Flierら, Science, 237, 405-8(1987)) は、肥満症においてアジプシン遺伝子の発現と、それに応じてセリンプロテアーゼホモログの循環レベルが減少することを開示している。より最近では、マウスの肥満遺伝子の蛋白産物 (O b) を動物に注射すると、それによって体重が減少し、また体重の減少が維持されることを、研究者らは実証した (例えば、Barinaga, Science, 269, 475-76(1995)に総説)。

したがって、脂肪細胞に遺伝子を導入することによりそれを改変するより良い手段が必要である。さらに、改変された脂肪細胞および脂肪組織インプラントが必要である。本発明の目的はそれらを提供することである。本発明のこれらの、そして他の目的および本発明の利点、並びに本発明の付加的な特徴は、後記する発明の説明から明確になるだろう。

発明の簡単な要約

本発明は、アデノウイルスを介した遺伝子導入および他の手段を含めて、インビボおよびex vivoで脂肪細胞を改変する方法およびベクターを提供する。本発明はまた、脂肪細胞組織の局所的な環境において使用されるか、あるいは分泌されて全身で使用される蛋白質のソースを提供するための、脂肪細胞へのインビボ遺伝子導入を提供する。特に、本発明は、肥満症を軽減する手段としての脂肪細胞への毒性遺伝子のインビボ導入、および血管新生を誘発する血管形成誘導物質をコードする遺伝子の導入を提供する。さらに、本発明は脂肪細胞の改変および宿主内の他の部位への脂肪細胞の導入を提供するが、それは改善された脂肪細胞の移植、治療または診断用の生物分子の移植可能なソースおよび他の利点を提供

する。

図面の簡単な説明

図1は、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）変換（%変換）に対するラット腹膜後方脂肪組織に送達されたAdCMVCATの用量（総pfu）のグラフである。

図2は、相対的CAT活性（%変換/mg蛋白）に対するラット腹膜後方脂肪組織へのベクター（AdCMVCAT）投与後の時間（日）のグラフである。矢印はベクター投与の時刻を示している。

図3は、ラット腹膜後方組織へのAdCMV.VEGF（●）またはAdCMV.Nu11（○）投与後の、VEGFレベル（ng/mg蛋白）に対する時間（日）のグラフである。矢印はベクター投与の時刻を示している。

図4は、ラット腹膜後方組織へのAdCMV.VEGF（●）、AdCMV.Nu11（○）、sham（■）またはAdCMV.VEGF（反対側）（△）投与後の、総血管数に対する時間（日）

のグラフである。矢印はベクター投与の時刻を示している。

図5は、ラット腹膜後方組織へのAdCMV.VEGF（●）またはAdCMV.Nu11（○）投与（ 10^9 pfu）後の、毛細血管数/mm²に対する時間（日）のグラフである。矢印はベクター投与の時刻を示している。

発明の詳細な説明

本発明は、プロモーターと、それに機能的に連結した、治療蛋白もしくは治療mRNA、すなわち治療効果を発揮し得る蛋白もしくはmRNA、をコードする核酸配列を含有するアデノウイルスベクターを、脂肪細胞に接触させることを含む、脂肪細胞の改変方法を提供する。該接触は、脂肪細胞へのアデノウイルスベクターの侵入が成され、該核酸配列が発現し、それによって治療蛋白もしくはmRNAの効果がもたらされるような条件下、特にインビボで行われるのが望ましい。

いかなる適切なアデノウイルスベクターも脂肪細胞への遺伝子導入に利用することができるが、本発明がさらに提供する以下のベクターを使用することが好ま

しい。例えば、脂肪細胞の遺伝子導入は、脂肪細胞特異的プロモーターと、それに機能的に連結した、治療蛋白もしくは治療mRNAをコードする核酸配列を含有するアデノウイルスベクターを用いて実施することができる。遺伝子導入は、構成的プロモーター（例えば、CMVプロモーター）と、それに機能的に連結した、(i) 全身に作用する分泌蛋白質、(ii) 脂肪細胞上もしくはその付近で作用する蛋白質、(iii) 毒素（特に、ジフテリア毒素A）、(iv) 血管形成誘導増殖因子（特に、血管内皮増殖因子（VEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅およびVEGF₁₈₉を含むVEGF））、(v) アジプシン（特に、セリンプロテアーゼホモログであるアジプシン）および(vi) 肥満遺伝子の蛋白産物、すなわちOb蛋白もしくはレプチン（特に、マウスもしくはヒト由来Ob蛋白）からなる群より選択される蛋白質をコードする核酸配列を含有するアデノウイルスベクターを用いて行うことができる。本発明はまた、本発明のベクターを含む宿主細胞、特に、脂肪組織の細胞を提供する。

アデノウイルスが細胞に侵入する能力を最適化するために、遺伝子導入は宿主内に導入される特定のアデノウイルスに指向性の中和抗体の非存在下で行うことが好ましい。このような抗体の非存在下では、アデノウイルスが細胞に結合し、および／または侵入するのを該抗体が妨げる可能性がない。中和抗体の存在を調べることは当業者には容易である。このような中和抗体の存在がアデノウイルスの細胞内送達の障害となる場合、別のアデノウイルスベクター、例えば別の血清型のアデノウイルスベクター（Cromptonら, J. Gen. Virol., 75, 133-139(1994)）または該抗体が指向するエピトープを欠く別のアデノウイルスベクターを用いることができる。

本発明はまた、脂肪組織（例えば、宿主に移植するためにドナーから単離される）および該脂肪組織に関連する血管形成誘導物質を含む脂肪組織インプラントを提供する。該脂肪組織インプラントは、インビボもしくはex vivoのいずれかにおいて、ドナー動物（ヒトを含む）の脂肪組織を、該インプラントを形成するのに使用される脂肪組織の血管新生を増大させる血管形成誘導因子もしくは組成物で改変することによって製造することができる。該インプラント（すなわち、

脂肪組織インプラント)が同一動物内の第二の部位に、あるいは免疫学的に適合する宿主(すなわち、第二の動物)内に移入される(移植される)と、該血管形成誘導因子もしくは組成物は、血管形成誘導因子もしくは組成物で改変もしくは処理されていない移植組織に比べて血管新生の増大を引き起こす。血管新生が増大すると、結果としてインプラントへの栄養および酸素の供給がよくなり、また第二の部位もしくは動物内のインプラントが産生する老廃物がよりよく除去される。このように栄養および老廃物の交換が改善されると、結果的に脂肪組織インプラントの移植後の脂肪細胞の消失が低レベルになる。免疫学的に適合するとは、インプラントを実質的に排除するように、該インプラントを形成する細胞を、免疫系が攻撃して破壊しないか、あるいはできない宿主を意味する。

本発明はまた、脂肪組織インプラントを製造するための、血管形成誘導蛋白および血管形成誘導DNAを用いる方法、並びにそれらを含む医薬組成物を提供する。

定義

「治療遺伝子」は、プロモーターと、治療蛋白もしくは治療mRNAをコードする核酸配列を含む。以下にさらに記載するように、このような治療遺伝子は、治療上の利益を提供するために、宿主細胞に導入すると細胞内環境に識別できる変化(例えば、デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)、ペプチドもしくは蛋白質のレベルの増加、あるいはそれらの産生もしくは分解速度の変化)が起こるように本発明においてベクター中にサブクローニングすることができる。「遺伝子産物」は、所定の核酸配列から転写されたまだ未翻訳のRNA分子(例えば、mRNAもしくはアンチセンスRNA)または前記核酸配列から転写されたmRNA分子から翻訳されたポリペプチド鎖(すなわち、蛋白質またはペプチド)のいずれかである。核酸配列または遺伝子は、該分子に沿う塩基配列が、該核酸配列または遺伝子が天然に通常見出される配列から変化していれば、すなわち、該塩基配列が天然に通常見出されなければ、「組換え体」である。本発明によれば、治療遺伝子は、全部もしくは一部が合成により作られたものであってよく、ゲノミックもしくは相補DNA(cDNA)配列を含んでもよく、また、

DNAもしくはRNAのいずれの形態で提供されてもよい。

治療遺伝子としては、VEGF蛋白の1つ、特にVEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅またはVEGF₁₈₉をコードするDNAに機能的に連結したプロモーターを含む「血管形成誘導遺伝子」が挙げられるが、それに制限されない。VEGF蛋白に加えて、aFGF、bFGFおよび上皮増殖因子もまた、本発明の方法における使用に適した他の血管形成誘導蛋白の例である。血管形成誘導遺伝子は「血管形成誘導mRNA」および、血管の形成（血管新生）を仲介し得るいかなる蛋白も意味する「血管形成誘導蛋白」をコードする。

同様に、リンパ形成誘導DNAは、「リンパ形成誘導蛋白」または「リンパ形成誘導mRNA」をコードする核酸配列に機能的に連結したプロモーターを含む。VEGF-Cはリンパ形成誘導蛋白の好適な例である。

「プロモーター」は、RNAポリメラーゼの結合を指示し、それによってRNA合成を促進するDNA配列である。「エンハンサー」は、近傍の遺伝子の転写を刺激または阻害する、シス作用性のDNAエレメントである。転写を阻害するエンハンサーは「サイレンサー」とも呼ばれる。エンハンサーは、エンハンサーがいずれの方向にも、数キロ塩基対に及ぶ距離を越えて、転写領域の下流の位置からでさえ機能し得るという点で、プロモーター中にのみ見られる、配列特異的DNA結合蛋白に対するDNA結合部位（「プロモーターエレメント」とも呼ばれる）とは異なる。本発明によれば、治療蛋白または治療mRNAをコードする核酸配列は、プロモーターがその核酸配列の転写を指示し得る場合に、該プロモーターに「機能的に連結している」（例えば、核酸配列とプロモーターの両方が1つの治療遺伝子を構成する場合）。

ベクター

「ベクター」は、宿主細胞にコード情報を導入するのに役立つ分子（例えば、アデノウイルスのようなウイルス）である。いかなる好適なアデノウイルスベクターも本発明の方法において利用することができる。すなわち、本発明に従って利用されるアデノウイルスベクターは、真核細胞への核酸の導入に適当であり、当業者がベクターという用語を理解しているその通りにベクターとして機能し得

るいかなるアデノウイルスベクターも包含し得る。本発明におけるアデノウイルスベクターは、1または2以上の異種および／または組換え配列、例えば、プロモーターおよび治療蛋白または治療mRNAをコードする核酸配列を含む治療遺伝子、ことによると1または2以上のエンハンサーまたはサイレンサー等を含む。配列は、それが通常見出されるのとは異なるゲノム内に存在していれば、「異種」である。

アデノウイルスはいかなる血清型のアデノウイルスであってもよく（例えば、「フィールズ ウイルス学」(Fields Virology), Fieldsら（編）, 第3版, N Y:Raven Press, 1996, 2111-2171）、好ましくはヒト細胞に形質導入および／また

は感染し得る血清型である。望ましくは、アデノウイルスは、核酸のコアと蛋白質キャプシドからなる完全なアデノウイルスのウイルス粒子（すなわち、ビリオン）を含むか、治療遺伝子を含むDNAが付随する蛋白質キャプシドを含むか、裸のアデノウイルスゲノムを含むか、あるいは当該技術分野で記載されるような、治療遺伝子の導入に使用し得る他のいずれかのアデノウイルスの具現物である。本発明においては、いかなる適当なアデノウイルスゲノムもアデノウイルスベクターとして働くか、もしくはその一部となり得る。好ましいアデノウイルスゲノムとしては、Ad5およびAd2由来のゲノムが挙げられ、それらは感染細胞から容易に単離されるか、市販されているか（例えば、Sigma Chemical Co., St. Louis, MOより）、あるいはこれらのウイルス保存株を定常的に維持している当業者から一般に入手できるものである。

本発明の目的からすれば、治療遺伝子の導入に用いられるアデノウイルスは野生型（すなわち、複製能力がある）であってよい。しかしながら、使用されるアデノウイルスのゲノムがインタクトである必要はない。実際、ウイルスが宿主細胞の機能を奪い、最終的に該細胞を破壊するのを防ぐために、使用に先立って、例えばUV照射によりアデノウイルスを不活化することもできる。あるいは、アデノウイルスは、ウイルスを複製欠損にし得る少なくとも1つの改変をその中に有する遺伝的材料を含んでいてもよい。また、アデノウイルスはアデノウイルス

キャプシドに連結した治療遺伝子からなっているとしてもよく、したがって、アデノウイルスゲノムを持たなくてもよい。さらに、該ウイルスは、当該技術分野で記載されているように（例えば、Wagnerら、上述）、哺乳動物細胞に対するリガンド（例えば、トランスフェリン）を含むDNA-ポリリジン複合体にカップリングしていてもよい。

アデノウイルスゲノムの改変としては、DNAセグメントの付加、DNAセグメントのリアレンジメント、DNAセグメントの欠失、DNAセグメントの置換、未メチル化DNAのメチル化、メチル化DNAの脱メチル化およびDNA損傷の導入が挙げられるが、それらに限定されない。本発明の目的からすれば、DNA

セグメントは小さいもので1ヌクレオチド、大きいもので36キロ塩基対（kb）（すなわち、アデノウイルスゲノムのサイズ）であればよく、あるいは、アデノウイルスビリオン中にパッケージングされ得る最大量（すなわち、約38kb）と等しければよい。

アデノウイルスゲノムのこのような改変は、アデノウイルスを複製欠損にすることができる。しかしながら、該改変は、アデノウイルスが適当な細胞表面受容体に結合する能力を変化させないことが好ましい。アデノウイルスゲノムの好ましい改変としては、E1、E2、E3および／またはE4領域における改変が挙げられる。

本発明において利用されるベクターは、いかなるタイプの適切なベクターをも構成するような配列を含んでもよい。例えば、該ベクターは、哺乳類の発現ベクター、サブクローニングされた治療遺伝子のコーディング配列がそれ自身のシス作用性制御エレメントの制御下にあるベクター、あるいは宿主細胞内での遺伝子組込みまたは遺伝子置換を容易にするように設計されたベクターを包含し得る。好ましくは、該ベクターは、哺乳類（最適には、ヒト）の細胞内での治療遺伝子の発現に適切な発現ベクターを包含する。

本発明のベクターはまた、アデノウイルスベクター以外のベクター（例えば、プラスミド、ファージ、リポソームまたは他のウイルスベクター）、あるいはア

デノウイルス配列と他のベクター配列との連結を包含し得る。しかしながら、例えば、アデノウイルスベクターの構築においては、これらの他のベクターを使用することができるが、脂肪細胞に、特にインビボで、遺伝子を導入するにはアデノウイルスベクターを使用することが好ましい（すなわち、ファージ、プラスミドまたは他のベクターと比較すると）。

ベクターの同定および／または選択は、当業者に公知の多様なアプローチを用いて達成することができる。例えば、特定の核酸配列を含むベクターは、ハイブリダイゼーション、ベクター上に存在するマーカー遺伝子にコードされるいわゆる「マーカー」遺伝子機能の有無、および／または特定の配列の発現によって同

定することができる。第一のアプローチでは、ベクター中の特定の配列の存在は、当該配列と相同な配列を含むプローブを用いて、ハイブリダイゼーション（例えば、DNA-DNAハイブリダイゼーション）により検出することができる。第二のアプローチでは、組換えベクター／宿主系は、抗生物質耐性、チミジンキナーゼ活性等のような、ある特定のマーカー遺伝子機能—これらの機能はベクター上に存在する該機能をコードする特定の遺伝子により引き起こされる—の有無に基づいて、同定し選択することができる。第三のアプローチでは、ベクターは、該ベクターにコードされる特定の遺伝子産物をアッセイすることによって同定することができる。このようなアッセイは遺伝子産物の物理学的、免疫学的または機能的特徴に基づけばよい。

治療遺伝子

本発明において使用されるベクターは、1または2以上の治療遺伝子を含んでもよい。ベクターが内部移行した細胞内で治療遺伝子が転写され得る限り、いかなる適切な治療遺伝子も本発明にしたがって使用することができる。

導入される治療遺伝子は、小さいもので1繰り返し単位（例えば、1ヌクレオチド）、大きいもので、単離し、合成し、または本発明の方法を用い、且つウイルスベクターのパッケージングの制限を考慮して、宿主細胞に導入することができる相応なものであり得るDNAを含むことができる。治療遺伝子は、治療蛋白もしくは治療mRNAをコードする核酸配列だけでなく、（プロモーターのよう

な) 非コーディング配列を含む。治療遺伝子の「核酸配列」は、リボザイム、すなわち、当該分野で記載されるような触媒的RNA種 (Hampelら, Nucleic Acids Research, 18, 299-304(1990); Cechら, Annual Rev. Biochem., 55, 599-629(1986)) を含めた、センスまたはアンチセンス配列、並びに操作された配列、すなわち、インビボで通常存在しない配列を含有することが好ましい。

治療遺伝子の核酸配列はベクター中でいずれの配向であってもよい。該治療遺伝子核酸配列は、天然の形態において通常コーディング配列 (例えば、センスま

たはアンチセンスmRNA配列) を制御するか、あるいは制御しない5' および/または3' 制御配列 (例えば、プロモーター) の制御下に置く (すなわち、「機能的に連結する」) ことができる。特に、いかなるプロモーターも、組換え治療遺伝子を作り出すために、核酸配列の天然のプロモーターと置換することができる。さらに、治療遺伝子は、塩基の欠失もしくは塩基の変化 (例えば、塩基のアルキル化)、シクロブチルダイマー、鎖の切断および核酸鎖の架橋形成を含む損傷を含んでいてもよいが、これらに制限されない。

疾患もしくは病態を治療するために、治療遺伝子は通常、RNAもしくは蛋白質レベルでその効果を発揮するだろう。例えば、スプライシングもしくは3' プロセッシング (例えば、ポリアデニル化) に影響を与える、アンチセンスメッセージのような治療mRNAもしくはリボザイムもしくは蛋白質をコードする核酸配列を含むことによって、治療遺伝子はRNAレベルでその効果を発揮することができる。あるいは、治療遺伝子の核酸配列は、細胞内で別の遺伝子の発現レベルに影響を与える (すなわち、ここで遺伝子発現とは、転写開始からプロセッシングされた蛋白質の産生までを通じてのすべての工程を含むものと広くみなされる) ことにより、とりわけ、mRNA蓄積速度の変化、mRNA輸送の変化および/または転写後調節における変化を介することにより作用する治療蛋白をコードすることができる。

また、導入された治療遺伝子の核酸配列によりコードされる蛋白質は、嚢胞性線維症の治療のための嚢胞性線維症膜貫通コンダクタンス調節因子cDNAのように、遺伝病の治療に使用することができる。治療遺伝子の核酸配列にコードさ

れる蛋白質は、結果的に細胞を殺すことによってその治療効果を発揮することができる。例えば、ジフテリア毒素A遺伝子の発現のように、遺伝子発現そのものが殺細胞を導くか、あるいは、遺伝子発現により、細胞をある特定の薬剤の殺作用に選択的に感受性となるようにすることができる（例えば、HSVチミジンキナーゼ遺伝子の発現により、細胞はアシクロビル、ガンシクロビル、およびFIAU（1-（2-デオキシ-2-フルオロ- β -D-アラビノフラノシル）-5- γ -ヨードウラシル）を含む抗ウイルス化合物に感受性となる）。導入遺伝子によって脂肪細胞を殺すという、本発明による肥満症の軽減において、このことは特に価値がある。同様に、治療遺伝子の核酸配列は血管形成誘導物質をコードするので、遺伝子発現の結果、新しい血管の増殖が起こり得る。

したがって、好ましくは、治療遺伝子の核酸配列は、全身に作用する分泌蛋白質および脂肪細胞上もしくはその付近で作用する蛋白質からなる群より選択される蛋白質をコードする。より好ましくは、治療遺伝子の核酸配列は、毒素、特にジフテリア毒素Aまたは毒素をコードする類似の遺伝子（Yamaizumiら、上述；Rossら（1993）、上述；Palmiterら、上述；Bernsteinら、上述；Behringerら、上述；Hughesら、上述）、p154ポリペプチド、特にヒトもしくはマウス遺伝子から得られるp154ポリペプチド（Serrero、上述）、アジプシン、特にセリンプロテアーゼホモログであるアジプシン（Flierら、上述）、レプチンのようなOb蛋白質、特にヒトもしくはマウスの肥満遺伝子から得られるOb蛋白質（Zhangら、Nature, 372, 425(1994)；Murakamiら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 209, 944(1995)；Considineら、J. Clin. Invest., 95, 2986(1995)) または当該分野で記載されているようなOBポリペプチド（例えば、英国特許出願第2,292,382号）、および増殖因子、特にVEGF、就中、VEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅（Muthauserら、J. Cell Biochem., 18A, DZ315(1994)）またはVEGF₁₈₉、当該分野で記載され（Cidら、上述）、以下でさらに述べるような他の血管形成誘導増殖因子からなる群より選択される蛋白質をコードする。

プロモーター

本発明においては、いかなるプロモーターも（すなわち、天然から単離された

ものであれ、組換えDNAもしくは合成技術により製造されたものであれ)、遺伝子の転写を提供するために使用することができる。好ましくは、プロモーターは真核(望ましくは哺乳動物)細胞内での転写を指示し得るものである。プロモーターの機能の仕方は、ベクター上にある1または2以上のエンハンサーおよび

／またはサイレンサーの存在によって変化し得る。真核細胞内での発現に適当なDNA配列(すなわち、「真核プロモーター」)は原核細胞内での発現に適当なDNA配列とは異なる。一般に、真核プロモーターおよび付随する遺伝的シグナルは原核の系では認識されないか、もしくは機能しないし、原核プロモーターは真核細胞内では認識されないか、もしくは機能しない。

真核細胞内で機能するプロモーター配列の比較から、保存された配列エレメントが明らかとなっている。一般に、RNAポリメラーゼIIによって転写される真核プロモーターは、転写開始を正確に位置づけるのに不可欠であるらしい-25位付近に集中する「TATAボックス」によって特徴づけられる。TATAボックスは、哺乳動物の系ではRNAポリメラーゼが約30塩基対(bp)下流から転写を始めるように指示する。TATAボックスは、転写開始点の上流約40bpおよび110bpに位置する少なくとも2つの他の上流配列と連携して機能する。通常、いわゆる「CCAATボックス」が2つの上流配列の1つとして働き、もう一方はしばしばGCに富んだセグメント(例えば、「GCボックス」(例えば、配列GGGCGGを含む)、または配列GCCACACCCおよびATGCAAAT)である。CCAATの相同性はDNAの異なる鎖にも存在し得る。上流のプロモーターエレメントもまた、当該分野で記載され、遺伝子のある特定のサブセットを特徴づけるらしいシグナルのうちの1つのような、特殊化したシグナルであるかもしれない。

転写を開始するためには、TATAボックスと上流の配列はそれぞれこれらの部位に結合する調節タンパク質によって認識され、RNAポリメラーゼIIが該DNA部分に結合して正しく転写を開始できるようにすることによって転写を活性化する。TATAボックスおよび上流配列外部の塩基変化は転写レベルにほとんど影響しないが、これらのエレメントのいずれかの中での塩基変化により、転写

速度が実質的に低下する（例えば、Myersら, Science, 229, 2342-7(1985); McKnightら, Science, 217, 316-324(1982)）。お互いの、および転写開始点に対するこれらのエレメントの相対的な位置および配向が、すべてではないがいくつかのコーディング配列の効率よい転写に重要である。例えば、いかなるT A T

Aボックスも存在しなくても、よく機能するプロモーターもある。同様に、RNAポリメラーゼIまたはIIIまたは他のRNAポリメラーゼにより認識されるプロモーターにとっての、これらのまたは他の配列の必要性は異なるかもしれない。

したがって、プロモーター領域は長さおよび配列が変化し、配列特異的DNA結合蛋白に対する1または2以上のDNA結合部位および／またはエンハンサーもしくはサイレンサーをさらに包含することができる。エンハンサーおよび／またはサイレンサーは、同様に、プロモーター自体の外側のベクター上に存在してもよい。本発明では、目的のコーディング配列を調節するために、治療遺伝子内で、構成的プロモーター、特にサイトメガロウイルス（CMV）プロモーターを優先的に用いる。このようなプロモーターおよびその変異体は当該分野で知られ、また記載されている（例えば、Boshartら, Cell, 41, 521-530(1985)）。しかしながら、Ad2またはAd5の主要後期プロモーターおよび3つに分かれたリーダー、ラウス肉腫ウイルス（RSV）ロングターミナルリピート並び、に文献に記載されているような他の構成的プロモーターのような、他のプロモーターもまた使用することができる。例えば、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター（Wagnerら, 上述）、メタロチオネイン遺伝子の調節配列（Brinsterら, Nature, 296, 39-42(1982)）、Gal4プロモーター、アルコールデヒドロゲナーゼプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼプロモーター、およびアルカリホスファターゼプロモーターのような酵母または他の真菌由来のプロモーターエレメントを用いることができる。同様に、哺乳動物細胞のゲノムまたはこれらの細胞で増殖するウイルス（例えば、アデノウイルス、SV40、単純ヘルペスウイルス等）から単離されたプロモーターを使用することができる。

構成的プロモーターの代わりに、プロモーターは、適当なシグナルに応答して

上向きおよび／または下向きに調節されるプロモーターであってもよい。例えば、TNFや別のサイトカインに応答するIL-8プロモーターのような誘導プロモーターを用いることができる。適切な誘導プロモーター系の他の例としては、メタロチオニン誘導プロモーター系、細菌のlacZYA発現系、テトラサイクリン発

現系およびT7ポリメラーゼ系が挙げられるが、それらに限定されない。さらに、異なる発生段階で選択的に活性化されるプロモーター（例えば、グロビン遺伝子は胚と成体で特異的に転写される）を用いることができる。

さらに、組織特異的プロモーター、すなわち、所定の組織内で優先的に活性化され、結果的に活性化された組織内で遺伝子産物を発現するプロモーター、特に脂肪細胞特異的プロモーターを用いることができる。本発明の好ましい脂肪細胞特異的プロモーターとしては、aP2遺伝子の調節領域（Rossら（1990, 1992および1993）, 上述）およびp154ポリペプチド遺伝子の調節領域（Serrero, 上述）が挙げられる。

脂肪細胞へのアデノウイルスを介した遺伝子導入

アデノウイルスを介した遺伝子導入において、1または2以上のアデノウイルスベクターが宿主細胞（これは好ましくは真核宿主細胞であり、最適には脂肪細胞である）に導入される。真核宿主細胞はインビトロまたはインビボで存在し得る。本発明によれば、細胞と本発明のアデノウイルスベクターとの「接触」は、いかなる手段によってなされてもよく、それによってベクターは細胞に形質導入される。このような形質導入は、いかなる適切な方法によってなされてもよい。好ましくは、アデノウイルスベクターは、感染または形質導入により、すなわち、ウイルスが細胞に入り込み、傍観者である高分子の取り込みを仲介する自然の能力（例えば、アデノウイルスが受容体を介してエンドサイトーシスされる能力）を用いて、導入される。しかし、ベクターは、他のいかなる適切な手段（例えば、トランスフェクション、リン酸カルシウムを介した形質転換、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、浸透圧ショックなど）によって導入されてもよい。

遺伝子は、広範な種々の異なるタイプの脂肪細胞に効果的に形質導入され得る。例えば、遺伝子は、アデノウイルス受容体の数、およびアデノウイルスに対する細胞表面受容体の親和性の両方において異なる細胞に導入され得る。本発明にお

いて、インビトロまたはインビボでの遺伝子の送達が意図される細胞の種類としては、鳥類細胞、魚類細胞、および限定はされないが、齧歯類、サル、チンパンジー、ネコ、イヌ、有蹄類（例えば反芻動物またはブタ）、そして好ましくはヒト細胞を含む哺乳類細胞が挙げられる。

医薬組成物

遺伝子導入ベクターは、適切な（例えば、医薬上許容される）、担体、アジュバント、ビヒクル、または希釈剤のような賦形剤を用いて、細胞との接触に適切な組成物に製造され得る。このような組成物を製造する手段および投与手段は、当該分野において記載されている（例えば、「レーミントン 薬科学」(Remington's Pharmaceutical Sciences), 第16版, Mack編 (1980) 参照)。適切には、該ベクターは、各々の投与経路について通常の方法で、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、軟膏剤、液剤、坐剤、注射剤、吸入剤およびエアロゾルのような、固形、半固形、液状またはガス状の形態に製剤化することができる。該組成物が標的器官に到達するまでに放出され、吸収されるのを防ぐために、すなわち、該組成物の予定時の放出を確実にするために、当該分野で知られている手段を利用することができる。本発明の組成物の効力を失わせることがない医薬上許容される形態を用いるべきである。医薬の剤形において、該組成物は、単独でまたは他の医薬上有効な化合物と適当に結合させて、また組み合わせて用いることができる。例えば、血管形成誘導刺激が必要な細胞へのVEGFポリペプチドをコードする核酸の送達に本発明の方法を適用する際（例えば、血管閉塞もしくは狭窄がある、すなわち血管新生もしくは循環の増大の必要がある場所での側副循環の増強において）、このような送達は、例えば、他の血管形成誘導増殖因子による処理、またはマトリゲル（腫瘍基底膜成分と増殖因子との複雑な混合物）(Muhlhauslerら, Circ. Res., 77, 1077-86(1995)) と組み合わせた使用等の、血管新生を

刺激する他の手段と組み合わせて用いることができる。

したがって、本発明の医薬組成物は、種々の経路によって動物体内の種々の部位に送達され特定の効果を達成することができる（例えば、Rosenfeldら(1991)、上述;Rosenfeldら, Clin. Res., 39(2), 311A(1991a);Jaffeら, 上述;Berkner, 上述を参照）。2つ以上の経路を投与に使用することができるが、ある特定の経路が別の経路よりも迅速かつ有効な反応を提供し得ることを、当業者は理解するであろう。局所または全身への送達は、体腔への製剤の外用もしくは滴下を含む投与、エアロゾルの吸入もしくは噴射、または筋肉内、静脈内、腹膜、皮下、内皮および局所投与を含む非経口投与により達成することができる。

本発明の組成物は、単位投与量形態で提供することができる。ここで各投与量単位、例えば、茶匙一杯量、錠剤、液剤、または坐剤は、予め決められた量の該組成物を単独で、または他の有効な薬剤と適当に組み合わせて含む。ここで使用する「単位投与量形態」という語は、ヒトおよび動物の対象にとって単位投与量としてふさわしい、物理的には別個の単位であり、各単位は、所望の効果を生じる十分な量と計算される、予め決められた量の本発明の組成物を、単独または他の有効な薬剤と組み合わせて、適切には、医薬上許容される希釈剤、担体またはビヒクルと共に含む。本発明の単位投与量形態の詳細は、達成されるべき特定の効果および特定の宿主における該医薬組成物に付随する特定の薬動力学に依存する。

したがって、本発明はまた、本発明のベクターを、好ましくは組成物の一部として、前記の投与経路のいずれかまたは当業者に知られ且つ特定の適用にとって適当な代替の経路を用いて投与することを含む、宿主への治療遺伝子の導入方法を提供する。該組成物の「有効量」は、宿主内で所望の効果を生じる量であり、それは当業者に公知の幾つかの終点を用いてモニターすることができる。宿主細胞への本発明による宿主細胞へのベクターの効果的な遺伝子導入は、治療効果（例えば、治療下の特定の疾患に付随するある症状の緩和）に基づいて、または、さらには、導入された遺伝子または宿主内での該遺伝子の発現を実証することによって（例えば、宿主細胞内の核酸を検出するための、シーケンシングと組み

合わせたポリメラーゼ連鎖反応、ノーザンもしくはサザンハイブリダイゼーシヨ

ン、または転写アッセイを用いるか、あるいは、導入した核酸にコードされるか、このような導入のためにレベルもしくは機能において影響を受けた蛋白質もしくはポリペプチドを検出するための、イムノブロット分析、抗体を介した検出、mRNAもしくは蛋白質の半減期研究、または特殊化されたアッセイを用いて)モニターすることができる。後記実施例に記載される1つの特殊化されたアッセイとしては、VEGF遺伝子にコードされた蛋白質の検出のためのウエスタンイムノアッセイが挙げられる。

ここに記載されるこれらの方法が決してすべてではなく、特定の適用に合ったさらなる方法は、当業者には明らかであろう。さらに、該組成物の有効量は、所望の効果を発揮することが知られている化合物との類似性を通じてさらに概算することができる(例えば、血管新生を刺激するために従来より用いられる化合物は、宿主に投与されるべきVEGF核酸の量に関する指標を提供し得る)。

さらに、本発明の組成物中に含まれる各有効薬剤の好ましい量(例えば、接触する各細胞当たりでは、好ましくは約1~少なくとも約1,000アデノウイルスプラーク形成単位(PFU)、より好ましくは約1~少なくとも約100アデノウイルスPFUであるが、上記より上、すなわち、約1,000アデノウイルスPFUを超えるか、あるいは上記より下、すなわち、約1アデノウイルスPFU未満のいずれかの、いかなる適当な量も利用することができる)は、インビトロまたはインビボのいずれかでの実施のために本発明の方法を最適化した上で、実務者によって利用される各成分の範囲の一般的指針を提供する。アデノウイルスベクターは、いかなる適当な容量の希釈剤または担体中に担持されてもよい。しかしながら、アデノウイルスベクター濃度は、通常 $2 \times 10^7 \sim 2 \times 10^{14}$ pfu/mlの範囲内であることが好ましく、より好ましくは約 10^{10} pfu/mlである。さらに、このような範囲は、特定の適用においては正当である、より高いまたはより低い量もしくは濃度の成分の使用を妨げるものではない。例えば、実際の用量およびスケジュールは、該組成物が他の医薬組成物と組み合わせて投与されるかどうかによって、あるいは薬物動態、薬物性向および代謝における

個

体間差によって変動し得る。同様に、インビトロでの適用においては、その量は、利用する特定の細胞株によって（例えば、細胞表面上に存在するアデノウイルス受容体の数、または遺伝子導入に用いられる特定のベクターがその細胞株内で複製する能力に基づいて）変動し得る。さらに、細胞あたりに添加されるベクターの量は、ベクターに挿入される治療遺伝子の長さおよび安定性、並びにその配列の性質によってもおそらく変動するだろう。このように、細胞あたりに添加されるベクターのアライバント (arrivant) は、特に、経験的に決定する必要のあるパラメーターであり、本発明の方法に固有ではない因子（例えば、合成に関わる費用）によって変化し得る。当業者は、特別な状況における必要性に応じて、いかなる必要な調整も容易に行うことができる。

また、これらの実施態様に関し、1または2以上の異なるベクター（すなわち、1または2以上の異なる治療遺伝子を各々コードする）がここに記載される方法において用いられる場合、細胞と本発明の種々の成分との接触は、いかなる順序で起こっても、あるいは同時に起こってもよい。好ましくは接触は同時に起こるだろう。好ましい態様において、本発明の成分ベクターは、細胞への接触の前に一緒に混合し、予備インキュベーションすることができる。多数のベクターを投与する場合、好ましくは、細胞に別のベクターを接触させる前後約6週間内に、第一のベクターを細胞に接触させる。いっそう好ましくは、細胞に別のベクターを接触させる前後約2週間内に、第一のベクターを細胞に接触させる。

本発明に従ってインビボで感染した脂肪細胞は、導入した遺伝子にコードされる蛋白質を別の解剖学的局所に送達するためのビークルとして、宿主内の別の部位に移すことができる。このような移送は、当該分野で知られているようないかなる適当な技術（例えば、Zhangら, Microsurgery, 15, 269-73(1994); Boyceら, Otolaryngol. Clin. North Am., 27, 39-68(1994); Mosconaら, Ann. Plast. Surg., 33, 500-6(1994); Krabatschら, J. Card. Surg., 10, 46-51(1995)を参照）によって成されてもよい。そのように導入される脂肪細胞は、同一の宿主由来である必要はなく、あるいは同一種の宿主由来である必要すらない。しか

しながら、好ましくは、脂肪細胞は同一の宿主内に導入される。

脂肪組織インプラント

本発明の脂肪組織インプラントは、ドナーの体内の第二の部位または免疫学的に適合する宿主に移植されると、該脂肪組織インプラントの血管分布を増大させるように処理された、該ドナーから除去された脂肪組織である。該インプラントは、脂肪細胞を含む脂肪組織に、プロモーターと、それに機能的に連結した、血管形成誘導蛋白またはmRNAをコードする核酸配列を含むアデノウイルスベクターを、インビボで接触させること（すなわち、上記の本発明の方法）によって、並びに他の手段によって製造することができる。

アデノウイルスベクターは、該インプラントの脂肪細胞に、血管形成誘導蛋白およびmRNAをインビボで送達するのに適当であるが、それらは*ex vivo*でも用いることができる。すなわち、脂肪組織を宿主から除去し、これに血管形成誘導遺伝子を含むアデノウイルスベクターを接触させて該インプラントを製造することができる。次いで、それを、（もし適切または必要であれば）成形して、該脂肪組織を元々除去した宿主または免疫学的に適合する第二の宿主に移植することができる。

1または2以上の血管形成誘導遺伝子をインビトロまたはインビボで脂肪組織へ導入してインプラントを形成するいかなる適当な手段も、本発明の脂肪組織インプラントを形成するのに用いることができる。血管形成誘導DNAは、ポリリン結合物と複合体を形成させ、インプラント中に組み込まれるべき脂肪組織に接触させることができる。あるいは、該DNAをリン酸カルシウム中で共沈澱させ、脂肪組織に接触させることができる。別の代替手段は、脂肪細胞または脂肪組織中の他の細胞に形質導入する能力を有する、アデノウイルスベクター以外のウイルスベクター、例えばレトロウイルス、アデノ随伴ウイルスまたはヘルペスウイルスベクターに、血管形成誘導遺伝子を組込み、そのベクターを脂肪組織に接触させるというものである。さらに、血管形成誘導DNAは、リポソーム、脂

質小胞、または陽イオン性もしくは両性イオン性脂質導入剤（例えば、リポフェクタミン（登録商標）、Gibco BRL, Bethesda, MD）を介して脂肪組織に導入す

ることができる。これらの遺伝子導入法のインビボおよびインビトロでの利用性および制限は、当業者には周知である。

血管形成誘導遺伝子を脂肪組織の細胞に導入するのではなく、あるいはそれに加えて、宿主内に移植された時に脂肪組織の血管分布を増大させる他のいかなる適当な仕方によっても脂肪組織を処理することができる。

したがって、血管形成誘導蛋白、特にVEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅、またはVEGF₁₈₉を発現する血管形成誘導遺伝子が、本発明のインプラントを形成するのに有用に用いられ得るが、血管形成誘導蛋白それ自体もまた、有用に用いることができる。VEGF、酸性FGF、塩基性FGFおよび上皮増殖因子は、本発明における使用に適当な血管形成誘導蛋白の例である。好ましくは、血管新生を刺激するのに十分な量の血管形成誘導蛋白を含有する溶液を、脂肪組織に灌流する。約 10^{-18} ～約 10^{-6} グラム活性蛋白/細胞、好ましくは約 10^{-15} ～約 10^{-12} グラム活性蛋白/細胞を、インプラントを形成するために脂肪組織に投与するのが望ましい。

脂肪組織に血管形成誘導遺伝子または蛋白を接触させるのに加えて、本発明のインプラントは、リンパ形成誘導遺伝子または蛋白（例えば、VEGF-C）で任意に処理される。いかなる特定の理論によっても縛られたくはないが、リンパ新生は、インプラントからの細胞の損失（すなわち、縮小化）を防ぐのを助ける移植部位から溢出した血液成分およびリンパが、鬱滞するのを防ぐのに有用であると信じられている。

有利なことに、血管形成誘導遺伝子または蛋白と接触させた移植脂肪組織は、宿主内に移植されると血管新生を向上させ、および/または移植後の縮小化の外見という形で現れる細胞の損失をより受けにくい。さらに、脂肪組織の脂肪細胞が改変されて血管形成誘導蛋白に加えて第二の治療蛋白質を含むなら、血管形成誘導蛋白によって生じる血管新生の増大は、脂肪組織外の部位への該第二の治療

蛋白質のより効率的な送達を提供する。

他の考慮すべき事柄

本発明による治療遺伝子の導入および発現に関しては、当業者は、例えば、転

写、mRNAの翻訳、および転写後プロセッシングのような、さまざまな遺伝的シグナルおよびプロセッシングが、細胞内の核酸および蛋白質／ペプチドのレベルを制御しているのを承知している。DNAのRNAへの転写は、前述のように機能的プロモーターを必要とする。転写量は、RNAポリメラーゼが特定のシグナルを認識して、そこで転写を開始し、そして終結することができる効率によって調節される。これらの工程、ならびに初期mRNAの伸長および他の工程はすべて、細胞内にさらに存在する種々の他の成分により、例えば、転写プロセスの一部となり得る他の蛋白質、細胞内に存在するリボヌクレオチドの濃度、などによって影響を受けやすい。

蛋白質の発現もまた、DNAシグナルによって調節されるRNA転写レベル、およびDNA鋳型のレベルに依存する。同様に、mRNAの翻訳には、最低でも、通常メッセージの5'末端の10～100ヌクレオチドの範囲内に位置するAUG開始コドンが必要である。至適な翻訳を生じる完全なコザックのコンセンサス配列に相似の、AUG開始コドンの横にある配列が、真核リボソームによるAUG開始コドンの認識に影響を与えることが分かっている（例えば、Kozak, J. Molec. Biol., 196, 947-950 1987) を参照)。また、細胞内での治療遺伝子の首尾よい発現には、得られる蛋白質／ペプチドの翻訳後の修飾が必要である。したがって、組換え蛋白質またはペプチドの産生は、DNA（またはRNA）がmRNAに転写される効率、mRNAが蛋白質に翻訳される効率、および翻訳後の修飾を実施する細胞の能力によって影響され得る。これらは全て、当業者が承知し、且つ所望の最終結果を達成するために、標準的手段を用いて操作し得る要素である。

このような考えに沿うと、組換えに続く蛋白質産生を最適化するには、治療遺伝子の導入に用いられるベクターは、治療遺伝子のコーディング領域の後にポリアダニル化部位をさらに含むことが好ましい。また、適切な転写シグナルはすべて（妥当であれば翻訳シグナルも）、治療遺伝子がそれが導入された細胞内で正しく発現するように、組換えベクター上に正確に配列されることが好ましい。所望であれば、該ベクターはまた、mRNAの産生を容易にするためにスプライス

部位（すなわち、スプライス受容体およびスプライス供与体部位）を組込むこともできる。さらに、導入される治療遺伝子が、プロセッシングもしくは分泌される蛋白質であるか、あるいは、例えば、ミトコンドリアや小胞体のような細胞内オルガネラ内で機能する蛋白質をコードするならば、該ベクターは、プロセッシング、分泌、細胞内局在化などのための適切な配列をさらに含むことが好ましい。

本発明のベクター上に位置するプロモーター、コーディング配列、治療遺伝子、マーカー遺伝子などに関し、このようなエレメントは前述の通りであり、独立に、あるいは結合して、カセットの一部として存在し得る。本発明において、「カセット」は、核酸配列のサブクロニングおよび回収を容易にするか（例えば、1または2以上の制限部位）、あるいは特定の核酸配列の発現を容易にする（例えば、ポリアデニル化部位またはスプライス部位）機能を有する特定の塩基配列である。

他の用途

本発明は、脂肪細胞への遺伝子導入によって直接的に治療し得る疾患あるいは病態について特段の有用性を有する、脂肪細胞への遺伝子導入の為の方法並びにベクターを提供するものである。脂肪細胞は宿主の代謝に広範な影響を及ぼすので、アデノウイルスによって仲介される遺伝子導入は、肥満症、糖尿病、体脂肪蓄積亢進、高血糖、高インスリン症、低温症、高血圧症、高コレステロール血症、高脂血症等からなる群より選択される障害のようなエネルギー貯蔵障害の治療に好適に用いられる。

本発明の方法はまた、他の疾患や病態の治療についても有用である。特に、本発明によれば、脂肪細胞に遺伝子を導入するためにアデノウイルスを使用することができ、且つ、脂肪組織内で限られた感染を少なくとも確立させ、続いて、該感染脂肪細胞が宿主内の別の部位へ移り、その部位で、該導入された遺伝子によってコードされた蛋白質がその効果を発揮することができる。遺伝子導入のためのビークルとして使用し得る他のある組織移植片とは異なり、脂肪細胞は通常、非免疫原性であるので、このような様式で脂肪細胞を遺伝子導入のためのビーク

ルとして使用することは有利である。

特に、本発明のこの方法は、血管形成誘導物質あるいは増殖因子等の蛋白質を、心臓または筋肉のような虚血領域に送達するために、あるいはより広く虚血疾患の治療において使用することができる。血管新生は、それにより新しい血管が現存する毛細血管から形成されるそのプロセスをいう。したがって、血管新生のプロセスならびにそのプロセスを調節する血管形成誘導因子は、胚発生、炎症および創傷治癒に関連しており、また糖尿病性の網膜障害、慢性関節リウマチ、癌や慢性の炎症性疾患のような病的状態に対しても寄与する（例えば、合衆国特許第5,318,957号（Cidら）；Brooksら，Science, 264, 569-571(1994)を参照）。

従って、創傷治癒を容易にする、および癌あるいは炎症（特に血管の炎症あるいは全身性の脈管炎）を治療する為の手段として血管新生を刺激すべく、血管形成誘導増殖因子を宿主または宿主の特定の部位に送達する為に、本発明のアプローチをさらに使用することができる。特に、該アプローチは、冠状バイパス手術のようなより侵襲性の手法を用いる代わりに、血管形成誘導遺伝子を含むベクターを注入し、遮断された領域の周りに新しい血管が増殖するのを誘導するという方法に使用することができる。本発明によれば、以下の、当該分野で記載されている血管形成誘導増殖因子をコードする遺伝子を、さらに血管形成誘導物質と共に使用することができる：血管内皮増殖因子（VEGF）、特にVEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅あるいはVEGF₁₈₉、酸性繊維芽細胞増殖因子（aFGF）、塩基性繊維芽細胞増殖因子（bFGF）、トランスフォーミング増殖因子、アルファおよびベータ腫瘍壊死因子、血小板由来増殖因子およびアンギオゲニン。

さらに、脂肪細胞組織の領域内で局所的に、あるいは、脂肪細胞内での産生に続いて血流中へ拡散する分泌蛋白質をコードする遺伝子の場合には、全身的に、その効果を発揮する蛋白質をコードする遺伝子を導入するための部位として、脂肪細胞をインビボで使用することができる。したがって、本発明の方法およびベクターはまた、脂肪細胞および／またはそれによって影響を受ける代謝プロセスに直接関連していない疾患や病態の治療にも使用することができる。

例えば、該方法をVEGF（特に、VEGF₁₂₁またはVEGF₁₆₅）、aFGF

FおよびbFGF、ならびに組織虚血を起こしたところで血管新生を刺激する為に局所的に作用することができる他の血管形成誘導増殖因子をコードする遺伝子を導入する為に好適に使用することができる。血管形成誘導物質をコードしている遺伝子のアデノウイルスベクターによる導入は、ある一定の持続期間、高濃度のこのような物質を局所的な様式で提供する為に使用することができる。すなわち、局所的な環境で血管新生を誘導し、しかも標的組織内での慢性的な血管新生の過剰誘導のリスク、および網膜や滑膜のように敏感な非罹患器官、あるいは不顕性の腫瘍内での無差別な血管新生誘導のリスクを最小限に抑えるのである (Folkmanら, J. Biol. Chem., 267, 10931-34(1992))。同様に、該方法は、好ましくは、癌細胞の治療に関して細胞障害効果を刺激するように作用し得る、5-フルオロウラシル (5-FU)、シスプラチンおよびその他の化学療法剤に対する感受性を局所的に増大させるのに使用することができる。

全身で作用する分泌蛋白質については、種々の治療遺伝子をコードするベクターを用いて本発明の方法を使用することができる。例えば、該治療遺伝子は、限定されるわけではないが、遺伝的欠損症の治療の為に α 1-アンチトリプシンまたはアデノシンデアミナーゼ、血友病の為に第VIII因子、出血性障害の為に他の血液凝固因子、慢性腎不全および骨髄抑制性障害の為にエリスロポエチン、宿主防御反応を増強する為に蛋白質 (例えば、抗ウイルス蛋白質または免疫調節剤) および抗腫瘍剤 (例えば、腫瘍抑制蛋白質およびインターフェロン類) の遺伝子を包含し得る。さらに、本発明の方法およびベクターは、抗高血圧薬や抗血液凝固薬、あるいは受容体アゴニストやアンタゴニストのような薬理剤を、これらの薬剤を生産する手段としてトランスフェクトあるいは感染させた脂肪細胞を用いて送達するのに使用することができる。

治療的血管新生を誘導する為にVEGF蛋白質の使用に関して、虚血が起こっているところへにVEGF蛋白質を投与することにより、インビボでの新しい血管のネットワークの発生を誘導できることがいくつかの研究で証明されている。ウサギ下肢の虚血モデルでは、VEGFの単回ボラスまたは反復投与により血管分布および血流の増進が引き起こされ、血行動力学的ならびに臨床的機能の両

方ともが改善された (Ferraraら, Ann. N.Y. Acad. Sci., 752, 246-256(1995); Takeshitaら, Circulation, 90, II228-II234(1994); Takeshitaら, J. Clin. Invest., 93, 662-670(1994a); Bautersら, Am. J. Physiol., 267, H1263-H1271(1994))。インビボでの血管新生に関して、VEGFとbFGFとの相乗効果が同様のモデルを使用して証明されている (Asaharaら, Circulation, 92, II-365-II-371(1995))。左回旋冠状動脈 (LCx) にアメロイド圧迫器 (ameroid constrictor) を用いたイヌの心筋虚血モデルにおいては、VEGFを留置カテーテルによって末梢LCx内に28日間毎日投与した結果、虚血心筋層への側副血流が増加し、また心筋内の血管分布密度が増加した (Banaiら, Circulation, 89, 2183-2189(1994))。また、アメロイド圧迫器を用いたブタの慢性虚血モデルにおいては、VEGFの心筋層への6週間にわたる連続投与の結果、虚血領域の減少、低コントラスト到達遅延 (less contrast arrival delay) および駆出率の改善と心筋壁の肥厚を示す磁気共鳴映像法によって実証されるように、心筋の血管新生が生じた (Pearlmanら, Nature Med., 1, 1085-1089(1995))。

遺伝子導入はある一定の持続期間、治療用蛋白質を高濃度に供給する「持続性放出力プセル」に相当するものを提供するので、ベクターによって仲介される手法を用いたVEGF遺伝子 (および他の遺伝子) の送達是有利である。対照的に、VEGF蛋白質およびある種の他の蛋白質は、極めて短い生物学的半減期 (例えば、VEGFについては6分間) を有する (Takeshitaら(1994a), 上述)。後

肢虚血の動物モデルが、VEGF蛋白質の動脈内への単回ボラスにより血管新生の誘導を示す一方で (Takeshitaら(1994a), 上述)、心筋虚血への冠状動脈内投与がそうであるように (Banaiら, 上述; Pearlmanら, 上述)、肢虚血への筋肉内投与は数日間にわたる反復投与を必要とする (Takeshitaら(1994), 上述)。対照的に、AdCMV.VEGFベクターは少なくとも5日間はVEGF蛋白質の持続的発現を提供することができる。また、遺伝子導入は虚血肢あるいは虚血心筋層への高濃度のVEGFの局所的な送達を提供するための戦略として用いることができる。対照的に、血管形成誘導因子の全身投与には、血管が乱れている部位あるいは網膜や滑膜、不顕性の腫瘍等の、血管新生が重大な悪い結果をもたらすような

部位で、不適切な血管新生を誘導するという理論上のリスクがある (Folkmanら, J. Biol. Chem., 267, 10931-10934(1992))。最後に、VEGFの全身投与は、ラットにおいて低血圧を引き起こすことが報告されている (Yangら, Circulation, 92, I-713(要約)(1995))。VEGFまたはその他の遺伝子 (特に血管形成誘導物質をコードしている遺伝子) のアデノウイルスを介した送達が有用であるかもしれない臨床応用としては、バイパス不可能な虚血性心臓疾患あるいは末梢の血管疾患、虚血吻合の増強、および創傷治癒の促進が挙げられる。

脂肪細胞への遺伝子送達の為のアデノウイルスの使用と比較すると、理論的には、現在臨床試験中の他の遺伝子導入システム (例えばレトロウイルス、アデノ随伴ウイルス、プラスミド-リポソーム複合体、および裸のプラスミドDNAの使用) (Crystalら, Science, 270, 404-410(1995)に総説) も、その代わりとして使用することができる。近位動脈へ送達された裸のプラスミドは、ウサギ後肢虚血モデル (Takeshitaら, 「ウサギ後肢虚血モデルにおける血管内皮増殖因子の動脈遺伝子導入に続く治療的血管新生」 (Therapeutic Angiogenesis Following Arterial Gene Transfer of Vascular Endothelial Growth Factor in a Rabbit Model of Hind Limb Ischemia), Proc. Natl. Acad. Sci., (1995)) において血管新生を誘導するのに十分なVEGFを供給するようであり、臨床試験において評価中ではあるが (Isner, 「再狭窄における動脈遺伝子導入」 (Arterial

Gene Transfer for Restenosis), Recombinant DNA Advisory Committee(RAC) Report No. 9508-118 (Office of Recombinant DNA Activities, NIH: Bethesda, MD (1995))、インビボで送達された裸のプラスミドからの発現は、アデノウイルスベクター系を用いて観察されるよりも数オーダーの規模で少ない (Crystalら (1995), 上述; Nabelら, Cardiovasc. Res., 28, 445-455(1994))。インビボでの遺伝子導入では、レトロウイルスベクターは、インビボでの不活性化に対する感受性および新しい遺伝子を導入するのに標的細胞の増殖を必要とするということで制限される (Crystalら (1995), 上述)。プラスミド-リポソーム複合体は、インビボでの心血管関連遺伝子の導入に関しては、比較的効率が悪い (Crystalら (1995), 上述; Nabelら, 上述)。対照的に、アデノウイルスベクターは、ここに記載

される脂肪組織への遺伝子の送達、特に、治療上の血管新生の為のVEGF関連遺伝子の送達に自らを理想的なものとする上述の特性を有する。例えば、アデノウイルスベクターは少なくとも1週間該遺伝子を高レベルで発現し、心血管組織に遺伝子を導入するのに有効である。このことは、VEGF蛋白質の短い半減期を考慮すると特に有利である。さらに、アデノウイルスを介した遺伝子発現の自己限定的性質は、標的組織内で過剰に血管新生を起こすリスクが減少すること（および時経時的に減少し続けること）を意味する。外来遺伝子を標的細胞の染色体内に組み込み、そのために、必要とされる後も長く血管形成誘導刺激を不適切に送達するリスク、および外来遺伝子の調節／発現による妨害のリスクを有しているアデノ随伴ウイルスおよびレトロウイルスベクターとは対照的に、アデノウイルスベクターによって導入された新しい遺伝子は染色体外の位置で機能する。さらに、アデノウイルスベクターは分裂中の細胞および分裂していない細胞の両方に、高レベルな効率で遺伝子導入を達成し、脂肪組織同様、骨格筋、心筋層、ならびに血管内皮のような多くの心血管関連部位での局所的且つ持続的なレベルの蛋白質発現を生じさせる。

前述の用途に加えて、本発明の脂肪組織インプラントは、美容整形あるいは再構築外科手術に特に有用である。例えば、そのようなインプラントは乳房または

陰茎の増大化に使用することができる。

本発明のさらなる用途や利益については当業者には明白であろう。

実施例

以下の実施例にさらに本発明を説明するが、勿論、何らその範囲を限定して解釈されるべきではない。

実施例 1

本実施例に、さらにここに記載され、且つMagovernらの「血管内皮増殖因子を発現しているアデノウイルスベクターによって非虚血性組織内で誘導される局所的血管新生」(Regional Angiogenesis induced in Non-Ischemic Tissue by an Adenovirus Vector expressing Vascular Endothelial Growth Factor) (Human Gene Therapy, 8, 215-227(1997)) に記載された実験で使用するアデノウイ

ルスベクターの構築について述べる。

インビボでの脂肪細胞への遺伝子導入を評価する為に、幾つかの複製欠損組換えアデノウイルスベクターを用いた。これらのベクターにはAd.RSV β gal、AdCMV CATおよびAdCMV.VEGFが含まれる。Ad.RSV β galは、前に記載 (Setoguchiら, 上述) されているように、E1-E3-の、Ad5をベースにしたベクターであって、プロモーターとしてのラウス肉腫ウイルスのロングターミナルリピートの制御下にある大腸菌 β ガラクトシダーゼコーディング配列、およびそれに続くSV40の核移行シグナルを含有している。AdCMV.VEGF(すなわちAdCMV.VEGF₁₆₅)はE1a-、部分E1b-、部分E3-のアデノウイルスベクターであって、165アミノ酸型のヒトVEGFのcDNA (すなわち、VEGF₁₆₅、Muhlhauserら, Circ. Res., 77, 1077-1086(1995)) を駆動するサイトメガロウイルス (CMV) の前初期プロモーター/エンハンサーを有する発現カセットをE1位に含有している。AdCMV CATはAdCMV.VEGFと似てはいるが、VEGFの配列の代わりにクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) のコーディング配列を含有している (Kass-Eislerら, Proc. Natl. Acad. Sci., 90, 11498-50

2(1993))。AdCMV.Null (AdCMV.VEGFと似てはいるが、発現カセット内に遺伝子を含まない) をコントロールのベクターとして用いた (Williamsら, J. Vasc. Surg., 19, 916-923(1994))。

AdCMV.VEGFの構築については、分泌の為のシグナル配列を含むVEGF₁₆₅のcDNA (Connら, Proc. Natl. Acad. Sci., 87, 2628-32(1990)) を、構成的なCMV前初期プロモーター/エンハンサーの制御下に該cDNAが置かれるように、発現プラスミド (Muhlhauserら(1995), 上述) 内へ挿入した。該発現プラスミドはまた、相同組換え配列として働くヌクレオチド3384からヌクレオチド5778 (すなわち、9.24から16.05マップ単位) のAd5配列を含有している。VEGF₁₆₅のcDNAを担持するプラスミドをプラスミドpJM17 (F. Grahamより) と共に293細胞 (ATCC CRL1573; ヒト胚の腎細胞株であってAd5によってトランスフォームされ、E1領域をトランスに発現する) に共トランスフェクションした。該プラスミドpJM17は全長のAd5 DNA (36 kb

）とpBRX、E1領域内に置かれた4.3 kbのインサートを含有し、したがってアデノウイルスのキャプシドへの最大のパッケージング限界 (McGroryら, Virology, 163, 614-17(1988)) をおよそ2 kb程超えている。293細胞内での発現プラスミドとpJM17との間の相同組換えの結果、E1領域とpBRXインサートが発現プラスミド由来の発現カセットで置換された。Ad.RSV β galおよびAdCMVcatを同様にして調製した。

これらのE1欠損アデノウイルスの増殖は293細胞に限られている。これらの実験の為に、種々のベクターで形質導入された293細胞を、10%熱非働化胎児ウシ血清 (FBS)、2 mMグルタミン、50 U/mlペニシリン、および50 μ g/mlストレプトマイシン (すべて、Biofluids, Rockville, MDから) を加えた改良最少必須培地 (IMEM) 中で増殖させた。共トランスフェクションに続いて、個々のウイルスプラークを単離し、293細胞内で増幅させ、前に記載された (Rosenfeldら, 上述) CsCl密度精製によって精製した。続いて、該調製物を10%グリセロールを加えた透析バッファー (10 mMトリス-塩酸,

1 mM $MgCl_2$, pH 7.4) 中、 $-70^{\circ}C$ で透析、保存した。各ウイルスストックの力価を以前に記載されたようにして、293細胞中でプラークアッセイにて測定した; 力価は常に $5 \times 10^9 \sim 2 \times 10^{11}$ pfu/mlの範囲であった。

実施例 2

本実施例では、インビボでの脂肪細胞組織へのアデノウイルスを介した遺伝子導入について説明する。

全ての研究に雄性Sprague-Dawleyラット (250から300 gm) を使用した。全ての手順と動物の飼育は規格化されたガイドラインに従った。動物をケタミン (100 mg/kg) およびキシラジン (2 mg/kg) の筋肉内投与により麻酔し、滅菌条件下で正中開腹術を行った。腸を腹部の反対側に移動させ、腹膜後方の脂肪を確認した。ベクターを投与する側 (右対左) を術前に無作為に決定した。一本の6-0非吸収性単繊維縫合糸を脂肪組織の中心に置き、注射する側

に印をつけた。50 μ lの容量のアデノウイルスベクターを30ゲージ針をつけた0.5 mlシリンジを用いて投与した。均一に送達されるように針の先端を脂肪の表面から5 mmの深さに置き、これは小さな膨疹が現れることにより確認された。擬 (sham) 処理した動物には確認用の縫合糸を置いたが、ベクターの投与は行わなかった。腸を正常な位置に戻し、腹部を非吸収性縫合糸で単層に縫合した。

ラットに2.2 $\times 10^9$ p f uのAd.RSV β galを感染させ、48時間後、この動物を屠殺した。ラット腹膜後方脂肪組織の切片を取り出し、4%ホルマリン中、4℃で3時間固定した。遺伝子導入、特に β -ガラクトシダーゼレポーター遺伝子によりコードされるlacZ遺伝子産物の存在を、以前に報告されているように (Setoguchiら, 上述; Mastrangeliら, 上述)、X-gal試薬 (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド, Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN) を用いて細胞を染色することにより決定した。細胞 (特に核の領域) が青色に染色されるとき、lacZ遺伝子産物の発現

は陽性と考えられる。Ad.RSV β galに感染後、脂肪細胞は青色に染色され、視覚化され (100 \times)、組織サンプルの暗部領域として顕微鏡写真に撮影された。対照的に、非感染細胞は青色に染色されず、AdCMV.Null処理した動物および実験を受けていない (非処理) 動物では β -ガラクトシダーゼは確認されなかった。これらの結果から、 β -ガラクトシダーゼレポーター遺伝子の導入、およびそれに続くこの遺伝子の発現がインビボで脂肪細胞において起こったことが確認される。

同様の実験で、AdCMVCATもまたインビボでラット腹膜後方脂肪組織に送達された。詳細には、総容量100 μ lのAdCMVCATを、0、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 および 10^9 p f uの投与量でラット脂肪組織に注射した (各投与量につきn=3の動物)。組織を48時間後採取し、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) のレベルを薄層クロマトグラフィーおよび蛍光画像装置分析 (Kass-Eislerら, 上述) により定量した。相対CAT活性は、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼによるクロラムフェニコールの

そのアセチル化対応物への変換率として記録した。

これらの結果（図1に示す）は、より高い投与量のAdCMV/CATを注射すると変換率が高くなることを示す。これはおそらく、感染多重度が高くなることにより遺伝子導入が増加するためと考えられる。さらにこれらの結果から、インビボでのクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼレポーター遺伝子の脂肪細胞への導入が確認される。 10^7 の投与量でグラフがピークに達するという事実は、アッセイの機能がこの投与量で飽和になることを示す。この飽和がなければ、より高い投与量でさらに高いレベルのCAT産生が検出されると思われる。

さらに、経時的な実験により、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ活性は遺伝子導入後7日間まで高いレベルで検出することができ、遺伝子導入後10日間までより低いレベルで検出することができることが示された（図2）。この実験で約 10^9 p f u / 50μ l のAdCMV/CATがラット腹膜後方脂肪に送達された。所定の時間で動物を屠殺し、CATアッセイを行った。値はCAT変換率

として決定し、これはmg蛋白質に換算するか、または換算しなかった。各時間点の条件につき3匹の動物を屠殺した。

AdCMV.VEGFベクターによりコードされるVEGF遺伝子もまたインビボでラットに送達された。詳細には、ラット脂肪組織に 10^{11} p f u のAdCMV.VEGFまたは陽性コントロールとして50 ngの組換えヒトVEGFを注射した。またラット脂肪組織に陰性コントロールとして 10^{11} p f u のAd.RSV β galを注射した。遺伝子導入後24時間以内にラット脂肪組織を切除し、細切し、ダルベッコ改変イーグル培地（2 ml / g組織）に37℃で6時間浸漬した。細胞を培養した培地のアリコート（ 25μ l）を還元条件下、15%ポリアクリルアミドゲル上で分離し、ニトロセルロース膜に転写し、成熟ヒトVEGFのN末端の最初の20個のアミノ酸に対するポリクローナル抗体（Tischerら、J. Biol. Chem., 266, 11947-54 (1991)）を、0.2%グルタルアルデヒドを用いてキャリアー蛋白質であるキーホールリンペットヘモシアニンに結合させた、1:500の希釈率の該ペプチド、およびストレプトアビジン・アルカリホスファターゼ複合体と共に用

いるためにビオチニル化された、1:10000の希釈率の二次抗体（ヤギ抗ウサギIgG Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA）とともに用いて、標準的なウエスタンブロットのアッセイの手順によりアッセイした。ウエスタンアッセイの結果から、AdCMV.VEGFベクターによりコードされるVEGF遺伝子のインビボでのラット脂肪細胞への導入、および宿主脂肪細胞によるVEGF₁₆₅蛋白質の産生が確認される。すなわち、適当な大きさのVEGF蛋白質のバンドが、陽性コントロール組換えVEGFを用いたとき、およびAdCMV.VEGFを導入したときは観察されるが、Ad.RSV β galを導入したときは観察されないことが確認される。

VEGF蛋白質の産生量は、ヒトVEGF蛋白質を検出する酵素結合性免疫測定法（ELISA）（Cytokit Red VEGF enzyme immunoassay, CytImmune Sciences, College Park, MD）を用いて定量した。ラット腹膜後方脂肪にコントロール陰性ベクターAdNu11（ 10^{11} 粒子/50 μ l）またはAdCMV.VEGF（ 10^{11} 粒子/50 μ l）のいずれかを注射した。この動物を直ちに、またはベクター投与の1、2、5、10もしくは20日後に屠殺した。脂肪を切除し、細切し、ダルベッコ改変イーグル培地（2ml/gm組織）に37℃で6時間浸漬し、分泌蛋白質を組織から培地に放出させた。組織培養培地のアリコート（25 μ l）をELISAの準備のために96穴プレートに入れた。製造業者の説明書に従ってアッセイを行い、VEGF濃度をmg蛋白質に換算した。各時点で、条件あたり2匹の動物を屠殺した。CATアッセイを3回ずつ行った。

図3に示すように、脂肪組織におけるVEGF発現の経時的な定量から、AdCMV.Nu11の投与は、試験したどの時点においてもベースラインを越える有意に増加したレベルのVEGFをもたらさなかったことが確認された。対照的に、AdCMV.VEGFの投与は、ベースラインのVEGF発現を越える6倍以上の増加をもたらし、ベクター投与の約5日後に発現のピークが現れた。10日目までにVEGFレベルはベースラインに戻った。AdCMV.VEGF投与の1、2および5日後のこれらの組織におけるVEGFのレベルは、AdCMV.Nu11投与後の組織におけるVEGFレベルに比べて有意に高かった（ $p < 0.05$ 、各時点）。ベクター投与直後に得

た0日目のVEGFのレベルは、実験を受けていない動物におけるレベルと同様であり、このことから、ウイルス製剤にVEGF蛋白質が混入していなかったことが確認される ($p > 0.05$)。処理した動物の血清中に、VEGFのベースラインレベルを越える増加は検出されなかった。これはアデノウイルスベクター送達が局在化した遺伝子導入ストラテジーを提供するという観察と一致する。

AdCMV.VEGFの投与の48時間後、VEGF蛋白質の存在を確認するために脂肪組織の免疫組織化学的染色を行った。これらの実験で、非特異的結合を防ぐためにスライド上のパラフィン切片を1.5%ヤギ血清で20分間ブロッキングし、次いで $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の一次抗体 (ウサギ抗ヒトVEGF; Santa Cruz Biotechnology) に1時間暴露した。陰性コントロール抗体であるウサギポリクローナル抗クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (5' → 3', Boulder, CO) を、各組織の反復実験切片に同じ濃度で適用した。試験抗体およびコントロ

ール抗体をリン酸緩衝食塩水 (PBS) で希釈した。アッセイコントロールとして、パラレルに行ったスライドからは一次抗体を除いた。これらのスライドを、ビオチニル化ヤギ抗ウサギIgG (ラット血清蛋白質に対してアフィニティー精製したもの)、ABC試薬 (Vector Laboratories, Burlingame, CO) (それぞれ30分間)、およびペルオキシダーゼ反応の基質としてジアミノベンジジン (4分間) に順次暴露し、次いでヘマトキシリンで対比染色した。

脂肪組織の免疫組織化学的染色から、AdCMV.VEGF処理した組織の脂肪細胞および内皮細胞の細胞質にVEGFが存在し、AdCMV.Null処理した組織にはVEGFが存在しないことが確認された。

コードされたVEGF遺伝子産物が血管分布に何らかの影響を及ぼすかを調べるためにインビボでの遺伝子導入の10日後、組織切片を検査した。腹膜後方脂肪組織へのAdCMV.VEGFの投与が脂肪組織に血管新生を引き起こすかどうかを調べるために2つのストラテジーを用いた。(1) 生組織中のインビボでの顕微鏡レベル (倍率30×) で評価した血管数の定量、および(2) 組織学による20 μm 未満の血管数の定量。全ての研究は 10^9 pfu のベクター投与量を用いて行われた。コントロール群には次のものが含まれる：注射直後の注射された腹膜後

方脂肪組織；反対側の（非処理側の）腹膜後方脂肪組織；擬注射した脂肪組織；およびAdCMV.Nullコントロールベクターを注射した腹膜後方脂肪組織。

生組織中の顕微鏡下の血管数の定量は、前記のように腹膜後方脂肪組織にAdCMV.VEGF（各時点につき最低3匹の動物）またはAdCMV.Null（各時点につき最低3匹の動物）を注射することにより行った。その直後、およびベクター投与の5、10、20および30日後に動物を麻酔し、腹膜後方脂肪組織を露出させ、注射した（同側の）組織および注射していない（対側の）組織をそのままの位置（in situ）で解剖顕微鏡下（Nikon SMZ-U, Morrell Instrument Co., Inc., Melville, NY）、15 cm（×30）の距離で検査した。写真スライドを用意し（Ektachrome 64T; Kodak, Rochester, NY）、このスライドを3 mの距離でスクリーン上に映写した。中心として確認用の縫合糸を用い、この縫合糸の周囲にin situ

で1 cmの距離に対応する直径の円をスクリーン上に描いた。この円を横断する血管数を3人の盲検観察者により数えてもらい、1人の観察者、1つのスライドにつき最低3つの血管を数えた。これらの3つの計数結果の平均を、各時点における各動物について脂肪組織の直径1 cmの円中の顕微鏡下の血管数として記録した。

脂肪組織中の20 μ m未満の血管数を定量するために、総血管数の定量に用いたのと同じ群の動物から、確認用の縫合糸の周りを中心とする同じ側の（処理した）腹膜後方脂肪組織および反対側の（非処理）脂肪組織の両方から1 cm³のサンプルを採取した。組織をPBS中ですすぎ、4%ホルマリン中4℃で保存した。サンプルをパラフィンに埋め込み、組織の表面に対して平行な面にある連続した5 μ mの横断面切片を50 μ mの間隔で得た。3つの切片をヘマトキシリンおよびエオシンで対比染色し、3つの切片をマッソンの三色染料で対比染色した。コンピューターで無作為に領域を抽出し、切片を本研究と関係のない病理学者によって倍率×400で盲検法で検査した。1つのスライドにつき5つの領域を、1つの領域につき最低4つの20 μ m未満の血管を数えた。1匹の動物につき6つのスライドを評価した。計数結果を平均化し、mm²当たりの血管数として記録した。結果を平均±平均の標準誤差として記録した。不對両側スチューデント

t 検定により統計学的分析を行った。

10^{11} p f u の AdCMV.VEGF のラット腹膜後方脂肪組織への送達後、増加した血管分布像が観察されたが（倍率 $100\times$ および $600\times$ ）、 10^{11} p f u の Ad.RSV β gal の送達後は観察されなかった。同様に、インビボで撮影した腹膜後方脂肪組織の顕微鏡写真は、AdCMV.VEGF の投与後、長期間にわたり顕著に増加した血管分布像を示した。特に、AdCMV.VEGF 投与の 30 日後の評価では、実験を受けていない動物、コントロール AdCMV.Nu11 ベクターを投与した動物の脂肪組織、および AdCMV.VEGF ベクターを反対側に投与した動物の反対側の（非処理）脂肪組織と比べて数倍多い血管が脂肪組織中に認められた。血管数の定量的評価から、AdCMV.VEGF 投与の 10 日後における脂肪組織中の血管数が、同じ動物の注射していな

い反対側のコントロール脂肪組織の血管数の 667%、擬処理および AdCMV.Nu11 コントロール脂肪組織の血管数のそれぞれ 310% および 256% に増加していることが示された（ $p < 0.01$ 、全ての比較、図 4）。重要なことに、AdCMV.VEGF 投与後 10 日目には脂肪組織中に VEGF が検出されなかったという事実にもかかわらず、インビボで定量した血管数の増加はベクター投与の 20 日後および 30 日後の脂肪組織においても維持されていた（ $p < 0.004$ 、全ての比較）。

毛細血管数の組織学的評価はインビボでの血管数定量の結果と一致していた。これらの実験で、全てのサンプルは倍率 $400\times$ で検査し、 α -アクチンで対比染色した。AdCMV.VEGF を注射した組織において、組織学的評価は、ベクター投与の 30 日後、実験を受けていないコントロールおよび AdCMV.Nu11 を注射したコントロール、ならびに AdCMV.VEGF ベクターを注射した動物の反対側の（非処理）脂肪組織と比べてより多くの毛細血管を示した。組織学的サンプルの定量的評価（図 5）では、AdCMV.VEGF を注射した脂肪組織中の毛細血管数は、5、10、20 および 30 日目において AdCMV.Nu11 コントロールと比べて 21~39% の増加を示した（ $p < 0.0002$ 、全ての比較）。即ち、倍率 $30\times$ で観察した脈管のインビボでの血管数定量と同様に、10 日目以降は VEGF が検出されなかったという事実にもかかわらず、増加した毛細血管数は持続した。

これらの結果から、インビボでの脂肪細胞へのアデノウイルスを介した遺伝子導入を、治療的效果を得るために用いることができることが確認される。特に、これらの結果は、VEGF cDNAを担持するアデノウイルスベクターが、相対的に無血管の正常な組織に局所的な方法で新しい血管の増殖を誘導できることを実証する。これはインビボでのアデノウイルス媒介遺伝子導入を、特に、脂肪細胞に関する治療的な血管新生に用いることができることを示す。

本明細書で引用した全ての参考文献（特許、特許出願および刊行物を含む）は言及したことで、その全体が本明細書に組み入れられるものである。本明細書の種々の部分の前に書かれた欄の表題または見出しは本明細書に見出しをつけるま

たは分けるために用いられているのであり、本発明の範囲を限定することを示すまたは意味すると解釈すべきではない。

好適な実施態様を強調して本発明を説明したが、当業者には好適な態様を変更し得ること（当分野における改良による変更を含む）、および本明細書で詳細に説明した以外でも本発明を実施できることは自明であろう。従って、以下に示す請求の範囲で定義される本発明の精神および範囲内に包含される全ての変形を本発明は含む。

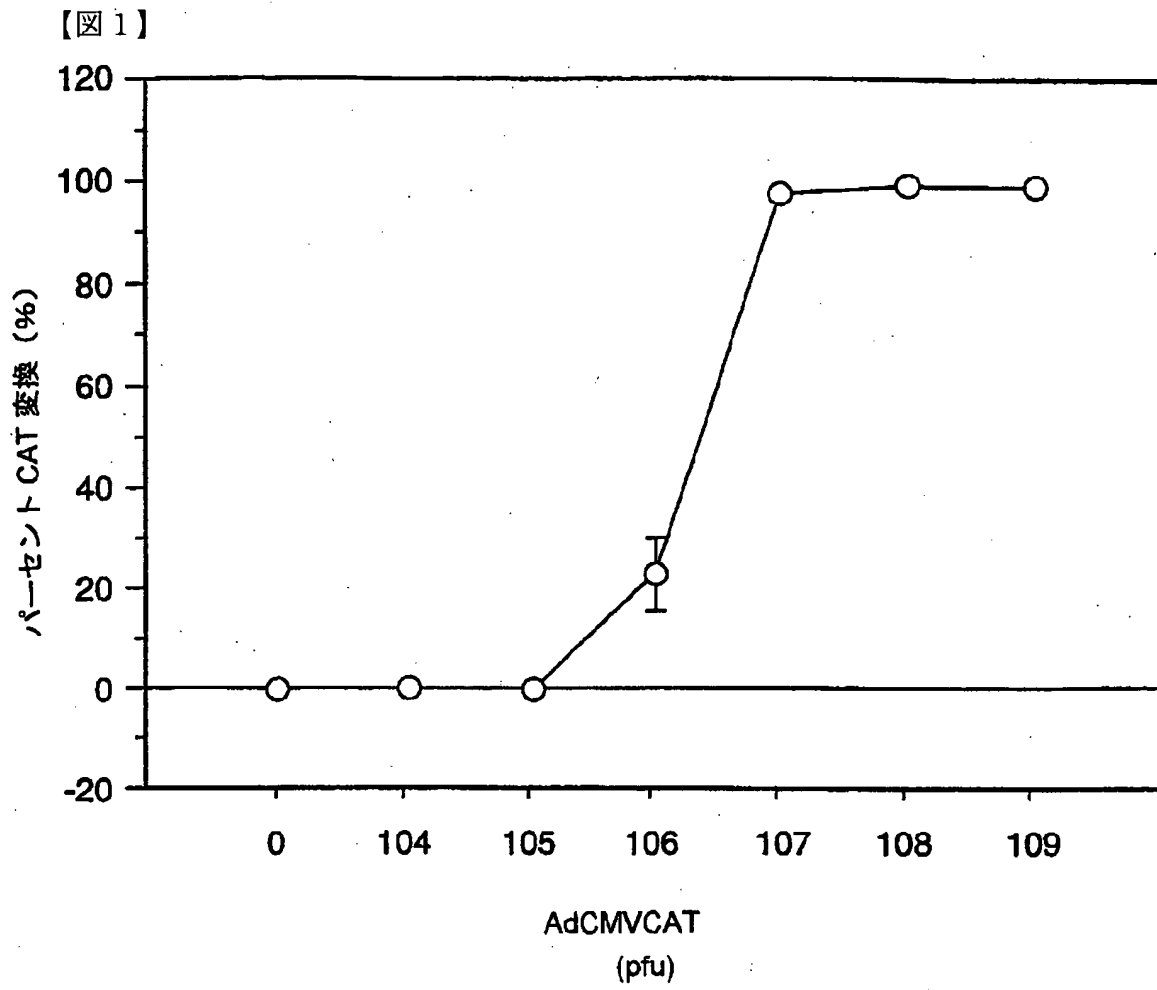


図 1

【図2】

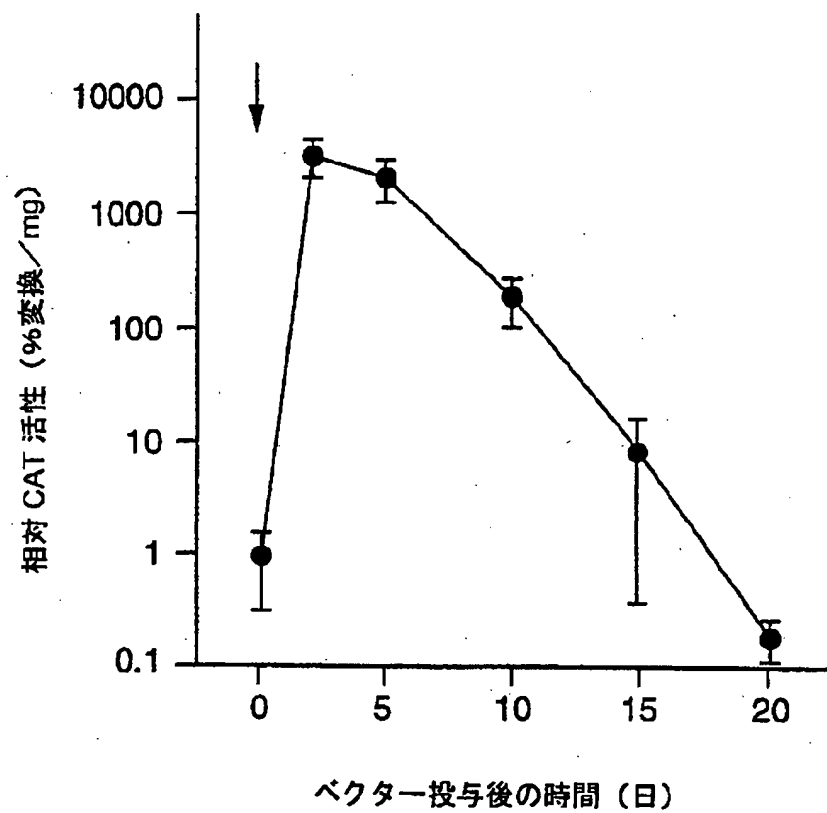


図2

【図3】

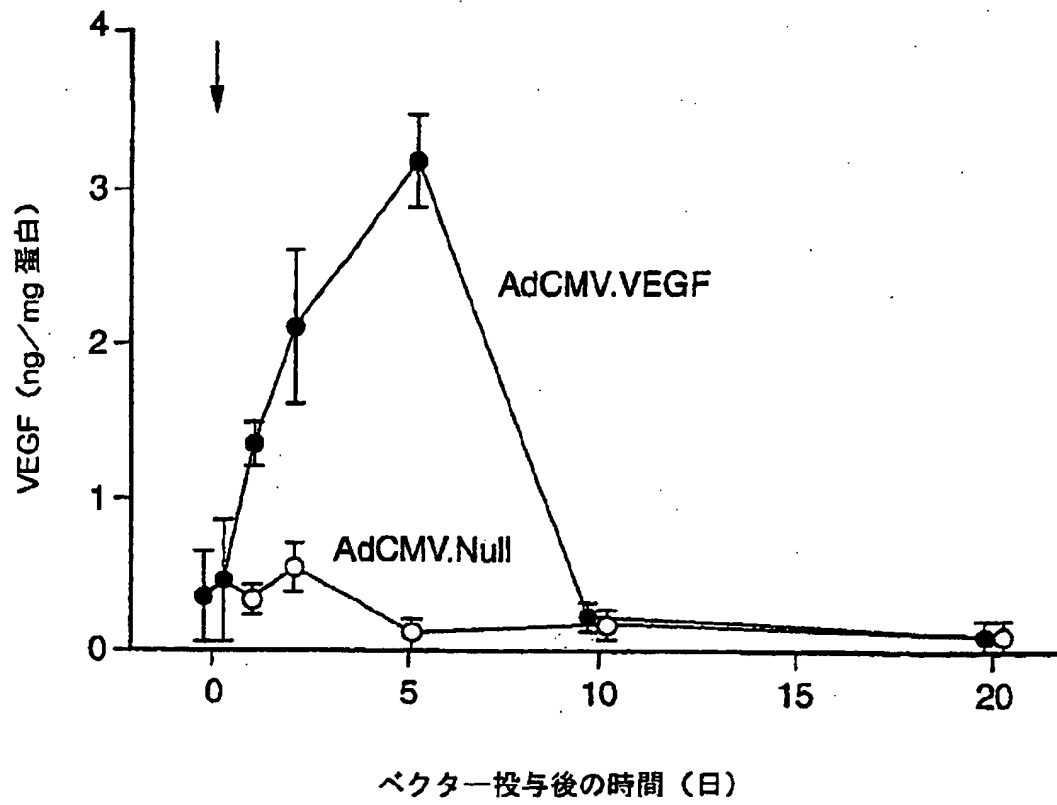


図 3

【図4】

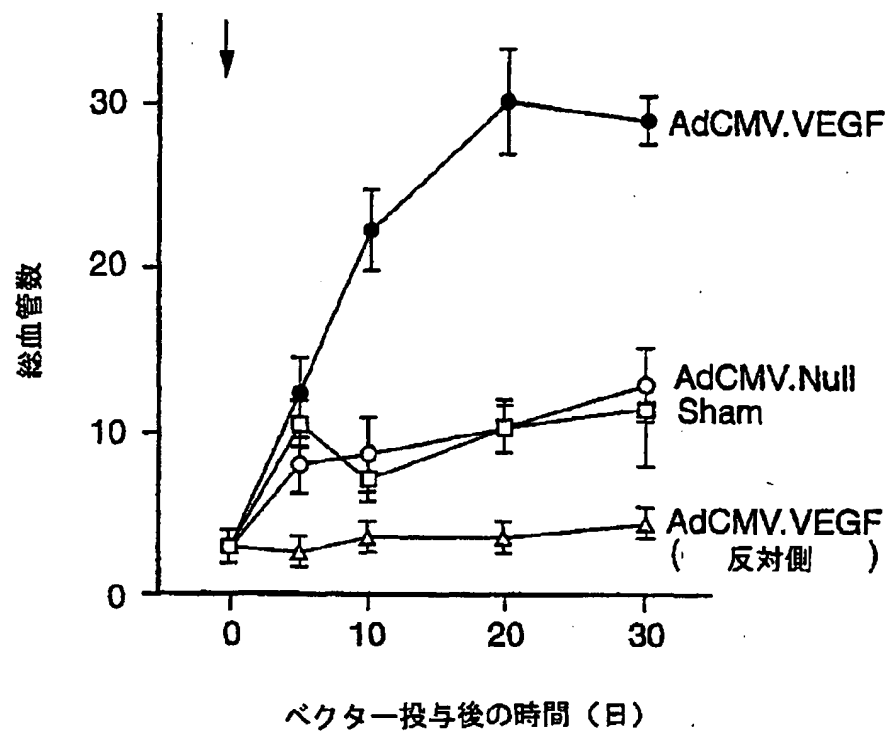


図4

【図5】

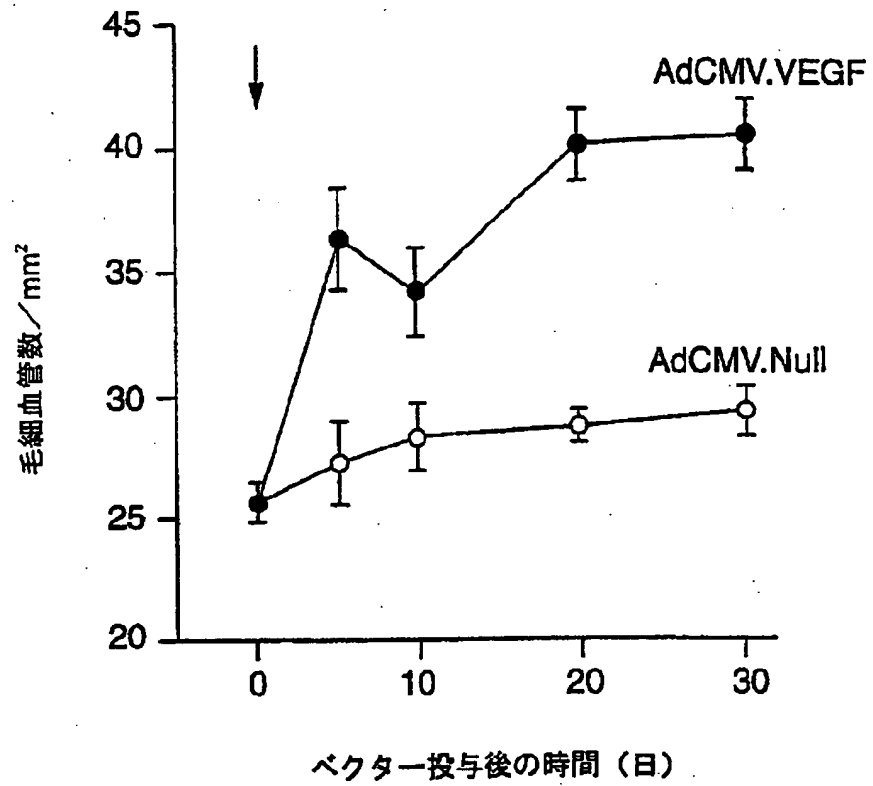


図5

【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】平成10年10月12日（1998. 10. 12）

【補正内容】

与（ 10^9 p f u）後の、毛細血管数/mm²に対する時間（日）のグラフである。矢印はベクター投与の時刻を示している。

発明の詳細な説明

本発明は、プロモーターと、それに機能的に連結した、治療蛋白もしくは治療mRNA、すなわち治療効果を発揮し得る蛋白もしくはmRNA、をコードする核酸配列を含有するアデノウイルスベクターを、脂肪細胞に接触させることを含む、脂肪細胞の改変方法を提供する。該接触は、脂肪細胞へのアデノウイルスベクターの侵入が成され、該核酸配列が発現し、それによって治療蛋白もしくはmRNAの効果がもたらされるような条件下、特にインビボで行われるのが望ましい。

上記の点を考慮すると、本発明は、脂肪組織の血管分布増進用医薬組成物の調製のための、プロモーターと、それに機能的に連結した、血管形成誘導蛋白をコードするDNA配列とを含むウイルスベクター、特にアデノウイルスベクターのような、遺伝子導入ベクターの使用を提供する。脂肪組織にベクターを接触させると、該ベクターは該脂肪組織に侵入し、その中で血管形成誘導蛋白を生産し、それによって該脂肪組織の血管分布を増大させる。好ましくは、該アデノウイルスベクターは複製欠損である。プロモーターは、脂肪細胞P2（aP2）遺伝子もしくはp154ポリペプチド遺伝子のいずれかの調節領域由来のプロモーターのように、脂肪細胞特異的であることが好ましい。あるいは、該プロモーターはまた、構成的であっても好ましい。該脂肪組織を宿主内のある部位から別の部位に移すことができる。好ましくは、該血管形成誘導蛋白は血管内皮増殖因子（VEGF）である。

いかなる適切なアデノウイルスベクターも脂肪細胞への遺伝子導入に利用することができるが、本発明がさらに提供する以下のベクターを使用することが好ましい。例えば、脂肪細胞の遺伝子導入は、脂肪細胞特異的プロモーターと、それに機能的に連結した、治療蛋白もしくは治療mRNAをコードする核酸配列を含

有するアデノウイルスベクターを用いて実施することができる。遺伝子導入は、構成的プロモーター（例えば、CMVプロモーター）と、それに機能的に連結した、(i) 全身に作用する分泌蛋白質、(ii) 脂肪細胞上もしくはその付近で作用する蛋白質、(iii) 毒素（特に、ジフテリア毒素A）、(iv) 血管形成誘導増殖因子（特に、血管内皮増殖因子（VEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅およびVEGF₁₈₉を含むVEGF））、(v) アジプシン（特に、セリンプロテアーゼホモログであるアジプシン）および(vi) 肥満遺伝子の蛋白産物、すなわちOb蛋白もしくはレプチン（特に、マウスもしくはヒト由来Ob蛋白）からなる群より選択される蛋白質をコードする核酸配列を含有するアデノウイルスベクターを用いて行うことができる。本発明はまた、本発明のベクターを含む宿主細胞、特に、脂肪組織の細胞を提供する。

アデノウイルスが細胞に侵入する能力を最適化するために、遺伝子導入は宿主内に導入される特定のアデノウイルスに指向性の中和抗体の非存在下で行うことが好ましい。このような抗体の非存在下では、アデノウイルスが細胞に結合し、および／または侵入するのを該抗体が妨げる可能性がない。中和抗体の存在を調べることは当業者には容易である。このような中和抗体の存在がアデノウイルスの細胞内送達の障害となる場合、別のアデノウイルスベクター、例えば別の血清型のアデノウイルスベクター（Cromptonら, J. Gen. Virol., 75, 133-139(1994)）または該抗体が指向するエピトープを欠く別のアデノウイルスベクターを用いることができる。

上記の点を考慮すると、本発明は、アデノウイルスベクターを含有する単離された脂肪組織を提供する。該アデノウイルスベクターは、プロモーターと、それに機能的に連結した、血管形成誘導蛋白をコードするDNA配列を含み、該脂肪組織をインビボで移植すると、該ベクターは発現して該脂肪組織の血管分布を増大させる。好ましくは、該アデノウイルスベクターは複製欠損である。好ましくは、該血管形成誘導蛋白はVEGFである。

本発明はまた、脂肪組織（例えば、宿主に移植するためにドナーから単離される）および該脂肪組織に関連する血管形成誘導物質を含む脂肪組織インプラント

を提供する。該脂肪組織インプラントは、インビボもしくはex vivoのいずれかにおいて、ドナー動物（ヒトを含む）の脂肪組織を、該インプラントを形成するのに使用される脂肪組織の血管新生を増大させる血管形成誘導因子もしくは組成物で改変することによって製造することができる。該インプラント（すなわち、脂肪組織インプラント）が同一動物内の第二の部位に、あるいは免疫学的に適合する宿主（すなわち、第二の動物）内に移入される（移植される）と、該血管形成誘導因子もしくは組成物は、血管形成誘導因子もしくは組成物で改変もしくは処理されていない移植組織に比べて血管新生の増大を引き起こす。血管新生が増大すると、結果としてインプラントへの栄養および酸素の供給がよくなり、また第二の部位もしくは動物内のインプラントが産生する老廃物がよりよく除去される。このように栄養および老廃物の交換が改善されると、結果的に脂肪組織イン

プラントの移植後の脂肪細胞の消失が低レベルになる。免疫学的に適合するとは、インプラントを実質的に排除するように、該インプラントを形成する細胞を、免疫系が攻撃して破壊しないか、あるいはできない宿主を意味する。

上記の点を考慮すると、本発明は、(a) 宿主内への移植のためにドナーから単離された脂肪組織および(b)血管形成誘導遺伝子を含む遺伝子導入ベクターを含有し、該宿主内への該脂肪組織の移植後、該血管形成誘導遺伝子が発現して該脂肪組織の血管分布を増大させる、脂肪組織インプラントを提供する。該脂肪組織インプラントは、リンパ形成誘導蛋白またはリンパ形成誘導遺伝子を含む遺伝子導入ベクターをさらに含有してもよい。該脂肪組織インプラントのドナーおよび宿主は同一であってもよい。該遺伝子導入ベクターは、好ましくはVEGFをコードする遺伝子を含む。

本発明はまた、脂肪組織インプラントを製造するための、血管形成誘導蛋白および血管形成誘導DNAを用いる方法、並びにそれらを含む医薬組成物を提供する。

請求の範囲：

1. 脂肪組織の血管分布増進用医薬組成物の調製のための、プロモーターと、そ

れに機能的に連結した、血管形成誘導蛋白をコードするDNA配列とを含む遺伝子導入ベクターの使用。

2. 該遺伝子導入ベクターがウイルスベクターである請求の範囲1の使用。
3. 該ウイルスベクターがアデノウイルスベクターである請求の範囲2の使用。
4. 該アデノウイルスベクターが複製欠損である請求の範囲3の使用。
5. 該プロモーターが脂肪細胞特異的である請求の範囲1～4のいずれかの使用。
6. 該プロモーターが、脂肪細胞P2 (aP2) 遺伝子もしくはp154ポリペプチド遺伝子のいずれかの調節領域由来である、請求の範囲5の使用。
7. 該プロモーターが構成的である請求の範囲1～4のいずれかの使用。
8. 該脂肪組織が、宿主内のある部位から別の部位に移される請求の範囲1～7のいずれかの使用。
9. 該血管形成誘導蛋白が血管内皮増殖因子 (VEGF) である請求の範囲1～8のいずれかの使用。
10. プロモーターと、それに機能的に連結した、血管形成誘導蛋白をコードするDNA配列を含み、且つインビボで該脂肪組織を移植すると発現して該脂肪組織の血管分布を増大させるアデノウイルスベクター、を含有する単離された脂肪組織。
11. 該アデノウイルスベクターが複製欠損である請求の範囲10の単離された脂肪組織。
12. 該血管形成誘導蛋白がVEGFである、請求の範囲10または11のいずれかの単離された脂肪組織。
13. (a) 宿主内への移植のためにドナーから単離された脂肪組織、および(b) 血管形成誘導遺伝子を含み、該宿主内への該脂肪組織の移植後、該血管形成誘導遺伝子が発現して該脂肪組織の血管分布を増大させる遺伝子導入ベクター、を含有する脂肪組織インプラント。
14. 該脂肪組織インプラントが、リンパ形成誘導蛋白またはリンパ形成誘導遺伝子を含む遺伝子導入ベクターをさらに含有するものである、請求の範囲13の

脂肪組織インプラント。

15. 該ドナーと該宿主が同一である請求の範囲13または14のいずれかの脂肪組織インプラント。

16. 該遺伝子導入ベクターがVEGFをコードする遺伝子を含む請求の範囲13～15のいずれかの脂肪組織インプラント。

【手続補正書】

【提出日】平成11年4月21日（1999.4.21）

【補正内容】

(1) 明細書第4頁下から第1行の「Genes Devel.」を「Genes Devel., 7,」に補正する。

(2) 請求の範囲を別紙の通り補正する。

[別紙]

請求の範囲：

1. プロモーターと、それに機能的に連結した、血管形成誘導蛋白をコードするDNA配列とを含む遺伝子導入ベクターを有効成分として含有する、脂肪組織の血管分布増進用医薬組成物。

2. プロモーターと、それに機能的に連結した、アジプシン蛋白またはOB蛋白をコードするDNA配列とを含む遺伝子導入ベクターを有効成分として含有する、脂肪組織の疾患治療用医薬組成物。

3. プロモーターと、それに機能的に連結した、分泌蛋白をコードするDNA配列とを含む遺伝子導入ベクターを有効成分として含有する、脂肪組織における該分泌蛋白の発現および脂肪組織による該分泌蛋白の分泌用である医薬組成物。

4. 該遺伝子導入ベクターがウイルスベクターである請求の範囲1～3のいずれかの医薬組成物。

5. 該ウイルスベクターがアデノウイルスベクターである請求の範囲4の医薬組成物。

6. 該アデノウイルスベクターが複製欠損である請求の範囲5の医薬組成物。

7. 該プロモーターが脂肪細胞特異的である請求の範囲1～6のいずれかの医薬組成物。

8. 該プロモーターが、脂肪細胞P2遺伝子もしくはp154ポリペプチド遺伝子のいずれかの調節領域由来である、請求の範囲7の医薬組成物。

9. 該プロモーターが構成的である請求の範囲1～6のいずれかの医薬組成物。

10. 該蛋白が分泌蛋白である請求の範囲1、2および4～9のいずれかの医薬組成物。

11. 該血管形成誘導蛋白が血管内皮増殖因子である請求の範囲1および4～10のいずれかの医薬組成物。

12. プロモーターと、それに機能的に連結した、血管形成誘導蛋白、アジプシン蛋白、OB蛋白または分泌蛋白をコードするDNA配列を含む遺伝子導入ベクターを含有する単離された脂肪組織（ここで該脂肪組織はインプラントの形態であってもよい）。

13. 該遺伝子導入ベクターがウイルスベクターである請求の範囲12の単離された脂肪組織。

14. 該ウイルスベクターがアデノウイルスベクターである請求の範囲13の単離された脂肪組織。

15. 該アデノウイルスベクターが複製欠損である請求の範囲14の単離された脂肪組織。

16. 該血管形成誘導蛋白が分泌蛋白である請求の範囲12～15のいずれかの単離された脂肪組織。

17. 該血管形成誘導蛋白が血管内皮増殖因子である、請求の範囲12～16のいずれかの単離された脂肪組織。

18. インプラントの形態であり、且つリンパ形成誘導蛋白、またはリンパ形成誘導遺伝子を含む遺伝子導入ベクターをさらに含有する請求の範囲12～17のいずれかの単離された脂肪組織。

19. 単離された脂肪組織内で血管形成誘導蛋白、アジプシン蛋白、OB蛋白ま

たは分泌蛋白を発現させる方法であって、プロモーターと、それに機能的に連結した、該蛋白をコードするDNA配列を含む遺伝子導入ベクターを単離された脂肪組織に接触させることにより、該遺伝子導入ベクターが該単離された脂肪組織内に入り、該脂肪組織内で該蛋白を発現するようにすることを含む方法。

20. 該遺伝子導入ベクターがウイルスベクターである請求の範囲19の方法。

21. 該ウイルスベクターがアデノウイルスベクターである請求の範囲20の方法。

22. 該アデノウイルスベクターが複製欠損である請求の範囲21の方法。

23. 該プロモーターが脂肪細胞特異的である請求の範囲19～22のいずれかの方法。

24. 該プロモーターが脂肪細胞P2遺伝子もしくはp154ポリペプチド遺伝子のいずれかの調節領域由来である請求の範囲23の方法。

25. 該プロモーターが構成的である請求の範囲19～22のいずれかの方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No.
PCT/US 97/11229

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/86 A61K48/00 C12N5/10 C12N5/06 A61F2/02 C07K14/52 A61K35/12 | | |
|--|---|--|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N A61K A61F C07K | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of database and, where practical, search terms used) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | SETOGUCHI, Y. ET AL.: "Ex vivo and in vivo gene transfer to the skin using replication-deficient recombinant adenovirus vectors" JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, vol. 102, no. 4, April 1994, pages 415-421, XP002044071 cited in the application | 1-3, 7, 16-18 |
| Y | see the whole document --- -/-- | 1-21, 23-28 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. | | |
| * Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search | | Date of mailing of the international search report |
| 16 January 1998 | | 03.02.98 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Chambonnet, F |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 97/11229

| C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|---|-------------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | CLAYMAN, G.L. ET AL.: "Transduction of normal and malignant oral epithelium by an adenovirus vector: the effect of dose and treatment time on transduction efficiency and tissue penetration" CANCER GENE THERAPY, vol. 2, no. 2, June 1995, pages 105-111, XP002044072 cited in the application | 1-3,7, 16-18 |
| Y | see page 107, column 2, paragraph 1; figure 1C | 1-21, 23-28 |
| X | --- EPPLEY, B.L. ET AL.: "BIOACTIVATION OF FREE-FAT TRANSFERS: A POTENTIAL NEW APPROACH TO IMPROVING GRAFT SURVIVAL" PLASTIC AND RECONSTRUCTIVE SURGERY, vol. 90, no. 6, December 1992, pages 1022-1030, XP002052281 | 21,22 |
| Y | see page 1027, paragraph 2 | 23-26 |
| Y | --- ROSS, S.R. ET AL.: "Targeted expression of a toxin gene to adipose tissue: transgenic mice resistant to obesity" GENES & DEVELOPMENT, vol. 7, no. 7b, July 1993, pages 1318-1324, XP002044074 cited in the application see the whole document | 1-6,9, 11-20 |
| Y | --- WO 95 19434 A (CALYDON INC) 20 July 1995 see page Y; claims 5,6,9,10,14-16 | 1-6,9, 11-20 |
| Y | --- MÜHLHAUSER, J. ET AL.: "VEGF165 expressed by a replication-deficient recombinant adenovirus vector induces angiogenesis in vivo" CIRCULATION RESEARCH, vol. 77, no. 6, December 1995, pages 1077-1086, XP002044444 see the whole document | 1-7, 10-21, 23-28 |
| Y | --- SETOGUCHI Y ET AL: "STIMULATION OF ERYTHROPOIESIS BY IN VIVO GENE THERAPY: PHYSIOLOGIC CONSEQUENCES OF TRANSFER OF THE HUMAN ERYTHROPOIETIN GENE TO EXPERIMENTAL ANIMALS USING AN ADENOVIRUS VECTOR" BLOOD, vol. 84, no. 9, 1 November 1994, pages 2946-2953, XP000562146 see the whole document | 1-9, 11-20 |
| | --- | |

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 97/11229

| C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|--|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | EP 0 518 389 A (UNIV JEFFERSON) 16 December 1992 see the whole document --- | 21 |
| X,P | KATAGIRI, H. ET AL.: "Overexpression of catalytic subunit p110alpha of phosphatidylinositol 3-kinase increases glucose transport activity with translocation of glucose transporters in 3T3-L1 adipocytes" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. (MICROFILMS), vol. 271, no. 29, 19 July 1996, MD US, pages 16987-16990, XP002044073 see the whole document | 17,18 |
| Y,P | --- | 1-21, 23-28 |
| P,X | WO 96 40172 A (LIFE MEDICAL SCIENCES INC) 19 December 1996 see page 1, line 1 - page 3, paragraph 3 | 21,22,26 |
| P,Y | see page 17, line 5 - line 17; claims 18,32-41 --- | 21,23-28 |
| P,Y | YAMAMOTO, K. ET AL.: "Human VEGF gene transfer into vascular prosthesis" CIRCULATION, vol. 94, no. 8, 15 October 1996, page I-637 XP002044445 see abstract 3721 ----- | 21,23-28 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. application No.

PCT/US 97/11229

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: As far as claims 1-10 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see continuation-sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

1. Claims: 1-20 and partially 21, 23-28

An adenoviral vector for modifying an adipocyte in vivo, comprising a promoter and, operably linked thereto, a nucleic acid sequence encoding a therapeutic protein or a therapeutic mRNA so as to effect entry of said adenoviral vector into said adipocyte, expression of said nucleic acid sequence and production of said protein or mRNA; a host cell comprising said vector; an adipose tissue implant comprising a) adipose tissue isolated from a donor for implantation into a host and b) said vector encoding an angiogenic growth factor.

2. Claims: 22 and partially 21, 23-28

An adipose tissue implant comprising a) adipose tissue isolated from a donor for implantation into a host and b) an angiogenic substance in context with said adipose tissue in the case said angiogenic substance is not a vector described in the first subject, that means an adenoviral vector encoding an angiogenic growth factor.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 97/11229

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9519434 A | 20-07-95 | AU 1686995 A | 01-08-95 |
| | | CA 2181073 A | 20-07-95 |
| | | EP 0755443 A | 29-01-97 |
| | | JP 9509049 T | 16-09-97 |
| | | US 5648478 A | 15-07-97 |
| ----- | | | |
| EP 0518389 A | 16-12-92 | US 4820626 A | 11-04-89 |
| | | AT 113850 T | 15-11-94 |
| | | AU 590573 B | 09-11-89 |
| | | AU 5830586 A | 11-12-86 |
| | | BR 8602659 A | 03-02-87 |
| | | CA 1293700 A | 31-12-91 |
| | | DE 3650134 D | 15-12-94 |
| | | DE 3650134 T | 22-06-95 |
| | | EP 0206025 A | 30-12-86 |
| | | JP 62049857 A | 04-03-87 |
| | | MX 165125 B | 28-10-92 |
| | | US 5441539 A | 15-08-95 |
| | | US 5035708 A | 30-07-91 |
| | | US 5194373 A | 16-03-93 |
| | | US 5230693 A | 27-07-93 |
| | | US 5372945 A | 13-12-94 |
| | | US 5312380 A | 17-05-94 |
| | | US 5628781 A | 13-05-97 |
| | | US 5131907 A | 21-07-92 |
| ----- | | | |
| WO 9640172 A | 19-12-96 | US 5681561 A | 28-10-97 |
| | | AU 6095596 A | 30-12-96 |
| ----- | | | |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テーマコード (参考) |
|--------------------------|--|---------|-------------|
| A 6 1 K | 38/48 | A 6 1 P | 3/10 |
| A 6 1 P | 3/04 | | 9/10 |
| | 3/06 | | 9/12 |
| | 3/10 | | 17/02 |
| | 9/10 | | 27/06 |
| | 9/12 | | 29/00 |
| | 17/02 | | 35/00 |
| | 27/06 | C 1 2 N | 15/00 |
| | 29/00 | | 5/00 |
| | 35/00 | A 6 1 K | 37/02 |
| C 1 2 N | 5/10 | | 37/24 |
| | 15/09 | | 37/547 |
| | Z N A | | Z N A A |
| | | | B |
| (81)指定国 | EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L U, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, KE, LS, MW, S D, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, F I, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, N O, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN | | |
| (72)発明者 | マガヴァン、クリストファー ジェイ、 アメリカ合衆国、ニュー ヨーク州 10021、ニュー ヨーク、イースト セヴ ンティエス ストリート、435、アパート メント 33エフ | | |
| (72)発明者 | ローゼンガート、トッド アメリカ合衆国、ニュー ジャージー州 07670、テナフライ、ドッグウッド レイ ン、2 | | |
| (72)発明者 | ホフマン、ロイド アメリカ合衆国、ニュー ヨーク州 11021、グレイト ネック、リンカーン ロード、11 | | |
| (72)発明者 | タルマー、ミア アメリカ合衆国、ニュー ヨーク州 10021、ニュー ヨーク、ヨーク アヴェ ニュー、1320、アパートメント 29エイ | | |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.